

Université de Sherbrooke

**Implication de VP1 dans le cycle lytique du
virus du polyome**

Par

Eric Samson

Département de microbiologie et infectiologie

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.sc.)**

Septembre 2003



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-94903-6

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-94903-6

The author has granted a non-exclusive license allowing the Library and Archives Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

RÉSUMÉ

Le but de mon travail est de vérifier si la protéine VP1 pouvait avoir un autre rôle dans le cycle lytique viral du Py que celui joué dans l'encapsidation. La protéine VP1 joue un rôle très important dans l'encapsidation et même dans la maturation du virus du polyome. Cependant, certains chercheurs ont déjà émis l'hypothèse que celle-ci pourrait avoir un rôle plus important au niveau du cycle viral. Lors des essais de recombinaison de RmI, notre groupe a démontré que la substitution du codon 265 de la protéine VP1 avait pour effet d'inhiber la recombinaison. À partir de ces résultats, nous avons voulu déterminer si cette mutation pouvait avoir une influence au niveau du cycle lytique du virus.

Afin de discerner ce qu'il en est réellement, nous avons utilisé des mutants créés dans RtsP15 qui ont une substitution d'a.a. du codon 265 de la protéine VP1 et nous avons caractérisés ces mutants. Ceux-ci sont P155 VP1 Glu 265, P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 His 265. La caractérisation effectuée comprend la mise en évidence des protéines virales tardives, des ARNm viraux tardifs et précoces, de l'ADN viral et du patron d'acétylation des complexes nucléoprotéiques viraux. Par cette caractérisation nous avons pu identifier que VP1 posséderait un rôle dans le « switch early to late » du cycle viral du polyome.

Nous proposons donc un modèle où VP1 jouerait un rôle d'activateur de la transcription de la phase tardive du virus du polyome par l'entremise de YY1.

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	I
Liste des illustrations.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Résumé.....	VI
 Introduction.....	 1
Préambule.....	1
Virus du polyome (Py).....	2
Cycle de réplication du virus.....	5
VP1 et la distribution des nucléosomes.....	11
VP1 et Ying-Yang1 (YY1).....	13
VP1 et le cycle lytique du virus du polyome.....	15
 Matériel et méthodes.....	 18
Cellules.....	18
Préparation de l'ADN avant la transfection.....	18
Transfection au DEAE-dextran.....	19
 Analyses des protéines virales tardives.....	 20
Extraction des particules agglutinantes.....	20
Extraction des protéines totales.....	20
Immunobuvardage.....	21
Infection.....	23
 Caractérisation de l'ADN viral.....	 23
Extraction de l'ADN de faible poids moléculaire.....	23
Analyse des fragments d'ADN par Southern.....	24
Préhybridation et hybridation.....	25
Marquage de l'ADN <i>in vitro</i>	26

Caractérisation de l'ARNm viral	27
Extraction de l'ARN.....	27
Analyse de l'ARNm par Northern.....	28
Préhybridation et hybridation.....	28
Marquage de l'ADN <i>in vitro</i>	29
Caractérisation de l'acétylation de complexes nucléoprotéiques	29
Traitement à la formaldéhyde.....	29
Extraction des particules agglutinantes.....	30
Ultracentrifugation.....	30
Immunobuvardage.....	31
Extraction de l'ADN des complexes viraux.....	31
Southern blot.....	31
Construction des ADN plasmidiques.....	32
Vecteur plasmidique.....	32
Plasmides recombinants.....	32
Mutants P155 de la protéine VP1.....	33
Résultats.....	37
A. Cinétique d'accumulation de VP1, déterminée par HAU.....	38
B. Détection des protéines tardives par immunobuvardage.....	41
C. Essais d'infections	44
D. Mise en évidence de l'ARNm tardif	47
E. L'expression des gènes tardifs requiert la présence d'une ou de plusieurs protéines synthétisées entre 19 et 26h après la transfection...	54
F. Les mutations introduites dans le codon 265 de VP1 n'influencent pas la stabilité de la matrice d'ADN.....	56
G. Étude des complexes nucléoprotéiques.....	61
Discussion.....	69
Production d'hémagglutine virale et production de protéines virales.....	69
Production des ARNm et de l'ADN	70
Production des complexes nucléoprotéiques viraux	74
Hypothèse	77
Remerciements.....	80
Bibliographie.....	81

LISTES DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	Organisation fonctionnelle du génome de Py.....	4
Figure 2.	Cycle de réplication du virus du polyome.....	9
Figure 3.	Structure et interaction des pentamères de VP1.....	10
Figure 4.	Conversion de RmI en P155.....	17
Figure 5.	Carte physique des vecteurs plasmidiques.....	35
Figure 6.	Carte physique de pNNRtsP155.....	36
Figure 7.	Le codon 265 de VP1 chez RtsP155 et nos mutants.....	39
Figure 8.	Analyse de la capacité des ADN viraux à produire du matériel hémagglutinant.....	42
Figure 9.	Effet des mutations sur la production ou l'accumulation des protéines tardives.....	45
Figure 10.	Essais d'infection avec nos mutants.....	49
Figure 11.	Fragments d'ADN convertis en sondes à hybrider avec les ARNm tardifs des Northern.....	50
Figure 12.	Effet des mutations sur la production des ARNm tardifs.....	57
Figure 13.	Détection de l'ADN viral présent dans les cellules transfectées.....	60
Figure 14.	Effet des mutations sur le niveau d'acétylation des histones des complexes viraux.....	68

LISTES DES ABRÉVIATIONS

a.a. :	Acide aminé
ADN :	acide déoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
Cyclo :	Cycloheximide
db :	double brin
DMEM :	«Dubelcco's modified Eagle medium»
DMSO:	diméthylsulfoxyde
DOC Na :	Déoxycolate de sodium
ECL:	«enhanced chemi-luminescence»
EDTA :	éthylènediamine tétraacétate
HAT :	histone acétyl transférase
HAU :	unité d'héماغglutination
HDAC:	histone déacétylase
HRP :	«horseradish peroxydase»
Kda:	Kilodalton
Kpb:	kilo paires de bases
LT :	antigène grand T (tumeur)
MT :	antigène moyen T (tumeur)
NLS :	signal de localisation nucléaire

nt :	nucléotide
Ori :	origine de réplication
pb :	paire de bases
PBS :	tampon phosphate salin
PFU :	unité de formation de plaque
Pt :	post-transfection
PVDF :	Difluorure de polyvinylidène
Py :	virus du polyome
RDE :	enzyme de destruction des récepteurs
SDS :	sodium dodécyl sulfate
ST :	antigène petit T (tumeur)
SV40 :	virus simien 40
SVF :	sérum de veau foetal
TBS :	tampon tris salin
TE :	Tris-EDTA
U.V :	rayon ultra-violet

Introduction

Préambule.

À la fin du XIX^e siècle, les hommes ont découvert des microorganismes qui passaient au travers des filtres où les bactéries ne passaient pas. De plus, ces microorganismes causaient aussi des maladies et parfois la mort des gens qui en étaient contaminés. On a donc effectué beaucoup d'études pour comprendre ce que c'était ces organismes microscopiques. Ces plus petits organismes fut appelé virus. Les virus ne peuvent se répliquer seuls. Pour y arriver, les virus doivent infecter les cellules afin de contourner la machinerie de celles-ci pour se répliquer. Beaucoup de chercheurs tentent de comprendre comment ces microorganismes arrivent à pénétrer leur hôte et les différents mécanismes impliqués dans la réplication de leur ADN ou ARN viral et de leur encapsidation.

Plusieurs virus ont été étudiés dont plus particulièrement un groupe de virus ayant des caractéristiques « particulières » : ce sont les Polyomavirus. Ces virus à ADNdb ont la capacité d'infecter productivement la cellule avant de la tuer. Alternativement ces virus peuvent transformer la cellule ou encore causer des tumeurs chez l'animal

entier. À l'intérieur de ce groupe on retrouve deux virus très étudiés soit le virus simien 40 (SV40) et le virus du polyome (Py). Pour notre étude, nous avons utilisé le Py comme modèle de travail. Ce virus a été découvert en 1951 par Ludwik Gross.

Virus du polyome (Py)

Le virus du polyome a une capside icosaédrale de 45 nm de diamètre qui n'est pas entourée par une enveloppe. Ce virus possède la capacité de se multiplier, ou d'induire la formation de tumeurs chez son hôte naturel, la souris (ce virus se révèle aussi tumorigène chez d'autres rongeurs dont le hamster). À l'intérieur de la capside virale, il y a un ADNdb de 5.3 Kpb complexé avec des histones cellulaires; donc dans la cellule, le génome viral peut donc se présenter sous la forme d'un minichromosome ayant une organisation assez semblable à la chromatine cellulaire. On retrouve dans le génome viral des éléments régulateurs dont une origine de réplication, deux promoteurs de transcription (précoce et tardif), une séquence stimulatrice (enhancer) de la réplication et de la transcription, ainsi que des signaux pour la coiffe et de la polyadénylation des ARN messagers (ARNm). En plus de ces régions régulatrices, le génome du Py a 6 séquences codant pour des protéines (figure 1,A). Ces gènes, lorsqu'ils sont transcrits, vont former des ARN précurseurs qui

seront épissés et modifiés en ARNm avant de se rendre au cytoplasme pour y être traduits en protéines (Tooze, 1980; figure 1, B). Tout d'abord, il y a trois gènes qui sont exprimés grâce à un promoteur précoce, codant respectivement pour les protéines grand T (LT), moyen T (MT) et petit T (ST). Ces trois protéines servent essentiellement à contourner la machinerie cellulaire au profit du virus et permettent la réplication de l'ADN viral; de plus, si le cycle lysogénique est favorisé, elles permettent au virus de transformer la cellule, ainsi que de causer des tumeurs. La protéine LT est aussi impliquée dans la réplication de l'ADN viral par son activité hélicase (Dodson et *al.*, 1987) et de plus, elle a la capacité d'immortaliser les cellules primaires (Rassoulzadegan et *al.*, 1983). Toutefois elle ne joue pas un rôle déterminant au niveau de la transformation. La protéine clé de la transformation de la cellule hôte par le virus du polyome est la protéine MT. Plusieurs études ont tenté d'expliquer par quels moyens cette protéine pouvait transformer la cellule hôte. Ce qui ressort de ces études, c'est que cette protéine interagirait avec d'autres protéines (protéine phosphatase 2A, pp60^{c-src}, Hsc70, ShcA) qui auraient une importance dans la régulation du cycle cellulaire (Campbell et *al.*, 1994; Courtneidge et Smith, 1983; Dilworth et *al.*, 1994; Pallas et *al.*, 1989; Pallas et *al.*, 1990; Walter et *al.*, 1987). Par ces interactions, la protéine MT influencerait certaines voies cellulaires qui auraient comme conséquence la modification de certaines protéines importantes

Figure 1. Organisation fonctionnelle du génome de Py

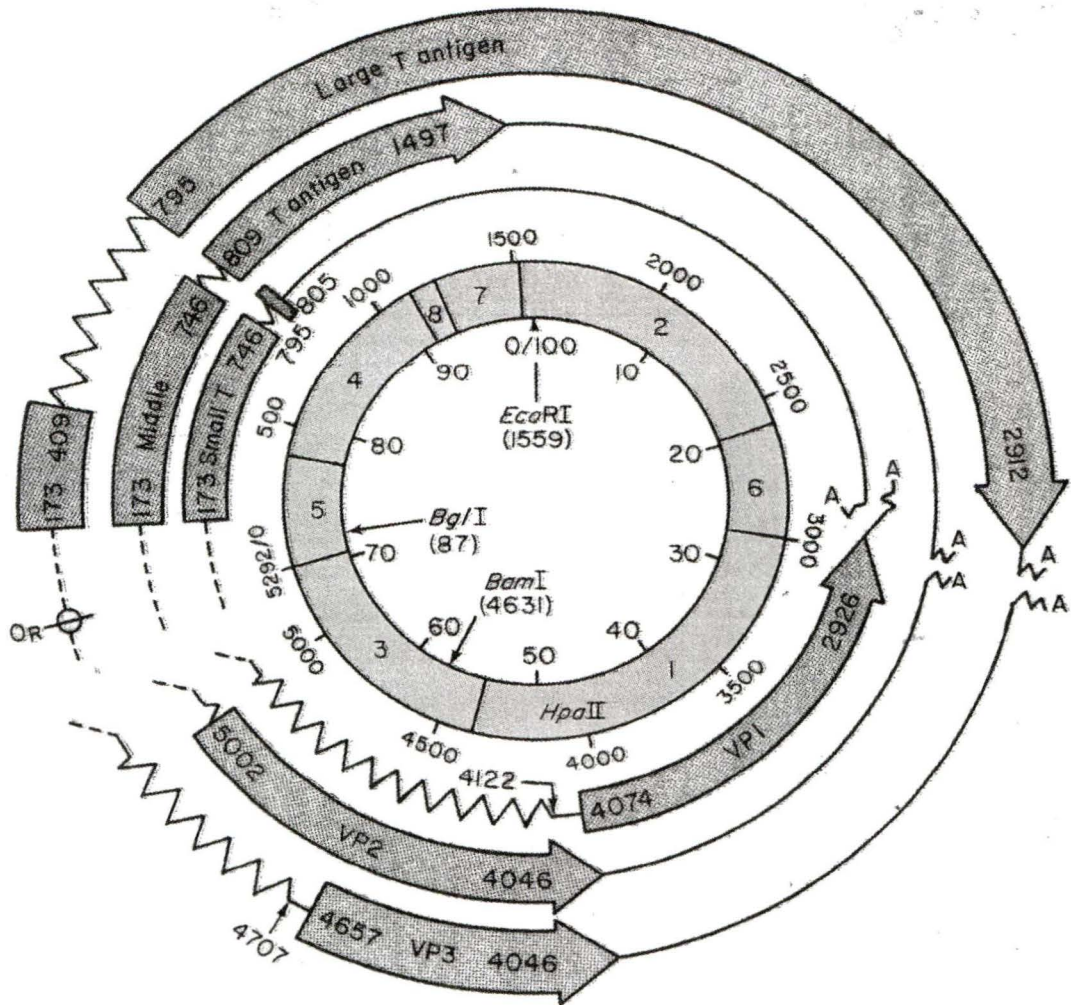
A. Carte physique de Py

La carte circulaire du génome viral (souche A2) est basée sur la disposition de ses huit fragments *Hpa II* et est divisée en 100 unités distribuées dans le sens horaire à partir de l'unique site de clivage pour EcoRI (0 / 00). L'origine se retrouve à la coordonnée 70.5 de la carte emplacement qui correspond au début de la numérotation nucléotidique (0 / 5292), elle aussi croissante dans le sens horaire. Bien que sur cette carte les régions régulatrices ne sont pas identifiées, celles-ci se retrouvent près de l'origine des deux côtés. Au delà de ces régions régulatrices, on trouve les séquences codant pour les protéines précoces et tardives (boîtes grises fléchées). Les gènes précoces codent pour les protéines grand T (LT), moyen T (MT) et petit T (ST), alors que les gènes tardifs codent pour les protéines VP1, VP2 et VP3. Les coordonnées en nt pour chaque protéine se retrouvent à l'intérieur des flèches. Les lignes en forme de zigzag représentent les séquences dont le transcrit est enlevé par épissage; les lignes continues au delà des têtes de flèche ne sont ni enlevées par épissage ni traduites. Alors que les lignes en zigzag ayant à leur extrémité un A représentent les séquences de polyadénylations pour l'ARN transcrit (Tooze, 1980).

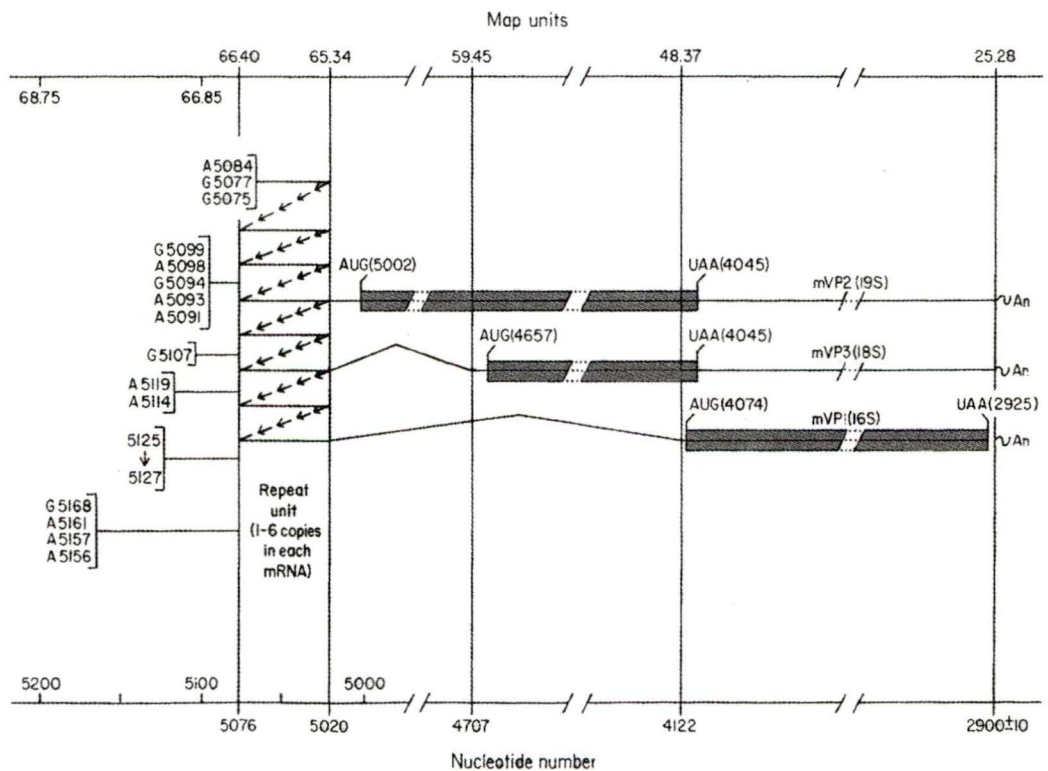
B. ARN messagers de la région tardive

Cette illustration représente essentiellement la façon dont les ARNm des gènes tardifs sont transcrits, épissés et traduits. Les boîtes grises représentent la portion codante des ARNm tandis que les lignes à gauche de celle-ci représentent les séquences épissées ou non. Transcrits d'un promoteur localisé dans la région 66.0 – 72.0 du génome, les ARNm primaires subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles avant d'arriver au stade d'ARNm matures de 16S (VP1), 18S (VP3) et 19S (VP2) (Tooze, 1980). Les portions transcrites de façon répétitives entre les nt 5076 et 5020 correspondent à des séquences exoniques non codantes importantes pour les étapes d'épissage et pour la stabilité des ARNm (Barret et al., 1995).

A



B



(phosphorylation, etc) qui activeraient une voie qui est habituellement réprimée et qui a pour conséquence de transformer la cellule hôte. De plus, il semble que cette protéine aurait aussi un rôle dans la maturation du virus, néanmoins le mécanisme reste nébuleux (Chen et Fluck, 2001). Alors, que la protéine ST est très peu connue, néanmoins il semblerait que cette protéine aurait un rôle dans la transformation aussi.

Les trois autres gènes de l'ADN viral sont sous le contrôle du promoteur tardif. Ces gènes codent pour les protéines VP1, VP2 et VP3. Celles-ci forment la capside du virus. Il est à remarquer que la séquence de la protéine VP3 est identique au 203 a.a du C-terminal de la protéine VP2 et le cadre de lecture du gène VP1 n'est pas le même que celui des deux autres gènes tardifs.

Cycle de réplication du virus

Afin de bien saisir les rôles des protéines du virus définis jusqu'à présent, il serait intéressant d'observer leur implication connue à l'intérieur du cycle de réplication du Py (figure 2). Tout d'abord, pour qu'il y ait invasion de la cellule, le virus doit interagir avec la surface cellulaire par l'intermédiaire de la protéine structurale VP1 qui va établir un lien avec des récepteurs qui ont à leur extrémité de l'acide sialique

(Fried et *al.*, 1981; Stehle et Harrison, 1997). Après l'établissement de cette liaison, le virus pénètre à l'intérieur de la cellule par endocytose. Dépendamment de l'origine et du type de cellules que le virus infecte, les molécules impliquées pour l'endocytose ne seront pas toujours les mêmes (Gilbert et *al.*, 2003). Ainsi donc, l'endocytose se fera soit par le mécanisme des caveoles, ou encore par un autre mécanisme indépendant des caveoles et des clathrines. Après l'endocytose, le virus s'achemine vers le noyau via les fibres d'actine et les microtubules (Gilbert et *al.*, 2003). Lors de cette progression, il y a décapsidation du virus. C'est à cette étape que, par l'intermédiaire de l'acide myristillique porté par son extrémité N-terminale; VP2 joueraient un rôle dans la décapsidation virale (Krauzewickz et *al.*, 1990 ; Sahli et *al.*, 1993). Parvenu à proximité du noyau, l'ADN viral, ou encore le minichromosome, est libéré pour pénétrer enfin à l'intérieur du noyau. C'est à ce moment que la phase précoce de l'expression du génome viral débute. Cette phase se traduit par la transcription des gènes précoces. Après transcription de ces gènes, maturation des produits de transcription et translocation des ARNms vers le cytoplasme, il y a traduction en LT, MT et ST. Ces protéines migrent alors vers le noyau afin de permettre au virus de contourner la machinerie cellulaire et de l'utiliser pour répliquer son ADN viral. Lorsque la réplication de l'ADN débute, il y a activation de la phase tardive de l'expression du génome viral (Acheson et *al.*, 1971 ; Adami et Carmichael,

1987 ; Liu et Carmichael, 1993). Les gènes des protéines tardives dites aussi structurales sont alors transcrits. C'est aussi à ce moment qu'on commence à détecter un précurseur d'ARN messenger géant (Acheson et *al.*, 1971). À partir de cet ARN géant (qui est équivalent à 10 fois le génome du virus), il aura production des ARNm tardifs par épissage et ceux-ci subiront des modifications post-transcriptionnelles avant d'être traduits. Comme les ARNm précoces, les ARNm tardifs vont se rendre au cytoplasme générant cette fois les protéines VP1, VP2 et VP3. La translocation de ces protéines se fait par un processus qui diffère quelque peu de celui des protéines précoces. Bien que les protéines VP2 et VP3 (protéines structurales dites mineures) possèdent un signal de localisation nucléaire (NLS) (Moreland et *al.*, 1991; Chang et *al.*, 1992), elles ne peuvent se rendre efficacement au noyau que sous la forme d'un complexe incluant VP1 (protéine structurale dite majeure) (Delos et *al.*, 1993; Forstova et *al.*, 1993; Cai et *al.*, 1994). Par ailleurs, la translocation de VP1 est plus efficace en présence des deux protéines mineures (Delos et *al.*, 1993; Cai et *al.*, 1994). Enfin, la translocation des trois protéines implique que les monomères de VP1 s'assemblent sous la forme de pentamères (Harrison, 1990; Liddington et *al.*, 1991; Rayment et *al.*, 1982). Chaque pentamère, qui correspond à une sous-unité structurale de la capside (ou capsomère), s'associe avec une seule copie de VP2 ou VP3 (Barouch et Harrison, 1994; Chen et *al.*, 1998; figure 3A). Il est donc

hautement probable que les associations VP1-VP2 et/ou VP1-VP3 se forment dans le cytoplasme précédant ainsi la translocation des protéines qui les composent (Barouch et Harrison, 1994; Cai et *al.*, 1994). Lorsque ces protéines se retrouvent à l'intérieur du noyau, il y a encapsidation de l'ADN viral. La capsid se s'assemblerait progressivement autour de l'ADN viral. L'assemblage de la capsid se fait par l'envahissement de la portion C-terminale des VP1 d'un pentamère à un autre pentamère, l'extrémité C-terminale envahissante étant capturée par la portion N-terminale d'un des VP1 du pentamère envahi (formation de « clamp », figure 3B). Ces interactions permettent la formation et le maintien de la structure de la capsid. De plus, lors de l'encapsidation, il aurait redistribution des nucléosomes du minichromosome viral afin que celui-ci puisse être encapsidé correctement (Ambrose et *al.*, 1986). Il a été déterminé que la protéine VP1 jouerait un rôle dans cette redistribution (Blasquez et *al.*, 1986), de plus, on sait que par son extrémité N-terminale la protéine VP1 lie l'ADN viral de façon non-spécifique (Chang et *al.*, 1993; Garcea et *al.*, 1987; Leavitt et *al.*, 1985; Moreland et *al.*, 1991). Enfin, à cette étape l'histone H1 serait éliminée de la chromatine virale (Schaffhausen et Benjamin, 1976). En effet, la chromatine virale contient de l'histone H1, alors que le virion en est dépourvu (LaBella et Vesco, 1980; Polisky et MaCarthy, 1975). La capsid du virus mature contient 360 copies de VP1

Figure 2. Cycle de réplication du virus du polyome

Le cycle débute lorsque le virus se lie aux récepteurs de la cellule hôte. Celui-ci pénètre alors, par endocytose, dans la cellule. Il y a encheminement du virus vers le noyau qui se décapside lors du trajet. Lorsque le virus est à proximité du noyau, l'ADN viral est relâché et pénètre à l'intérieur du noyau. C'est à ce moment que, la phase précoce d'expression du génome viral débute. Cette phase se traduit par la transcription des gènes précoces, les ARN produits seront épissés et transformés en ARNm. Ceux-ci seront transportés vers le cytoplasme pour y être traduits en protéines. Après leur synthèse, les protéines précoces retournent au noyau et interagissent avec la machinerie cellulaire afin de la détourner et l'utiliser pour répliquer l'ADN viral. Dès que la réplication de l'ADN viral débute, la phase tardive de la transcription est activée. Le mécanisme exact de l'enclenchement de cette phase tardive n'est pas bien connu. Toutefois, il y a transcription des gènes tardifs en préARNm qui seront modifiés tout comme les préARNm des gènes précoces. Ces ARNm vont se rendre au cytoplasme afin d'y être traduit en protéines structurales. Ces protéines retournent au noyau pour s'assembler autour de l'ADN viral afin de former la capsid. Il y a maturation de ce provirion en virion et enfin, il y aura lyse de la cellule et libération des virions. (Basic of virology, 1992)

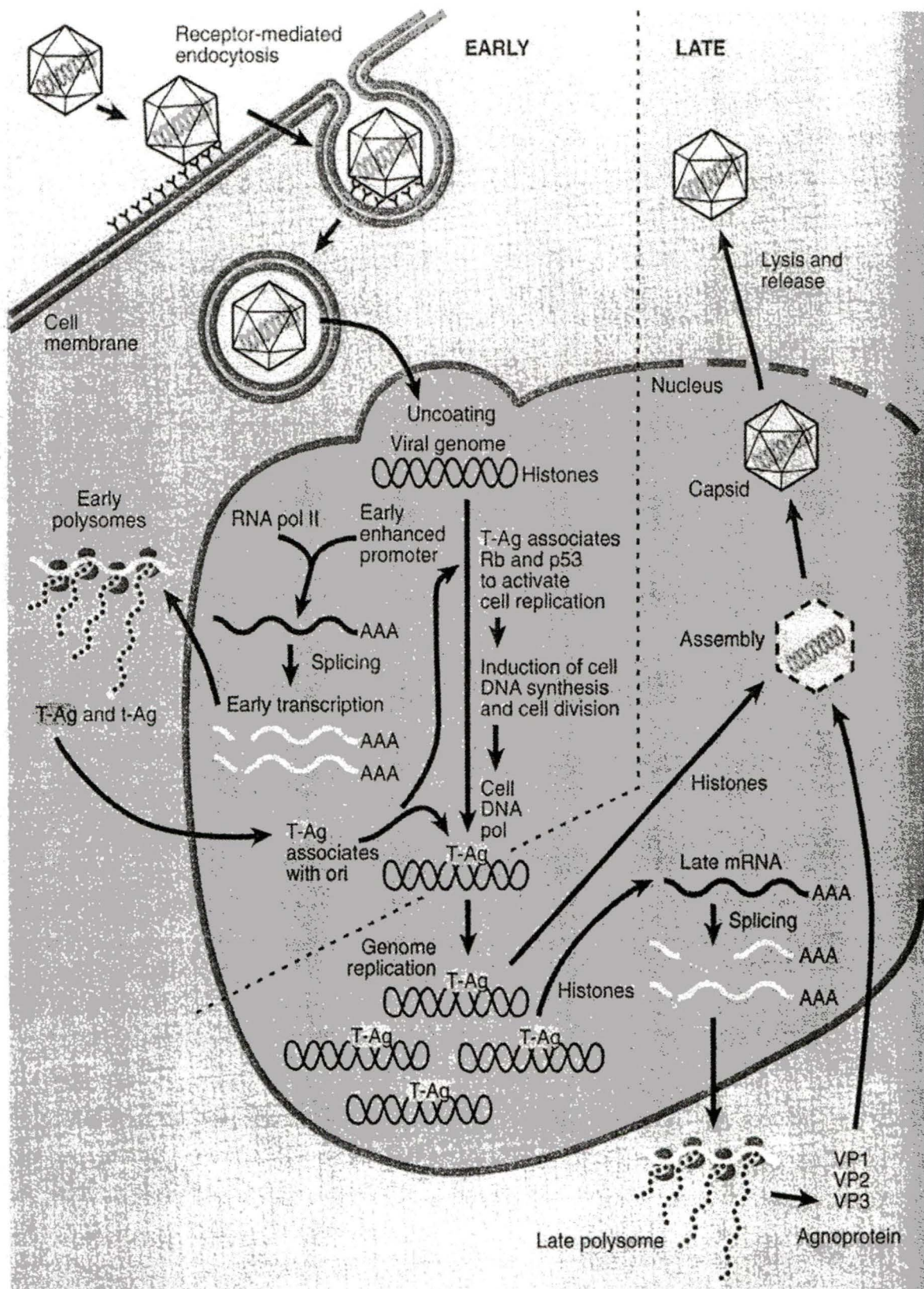


Figure 3. Structure et interaction des pentamères de VP1

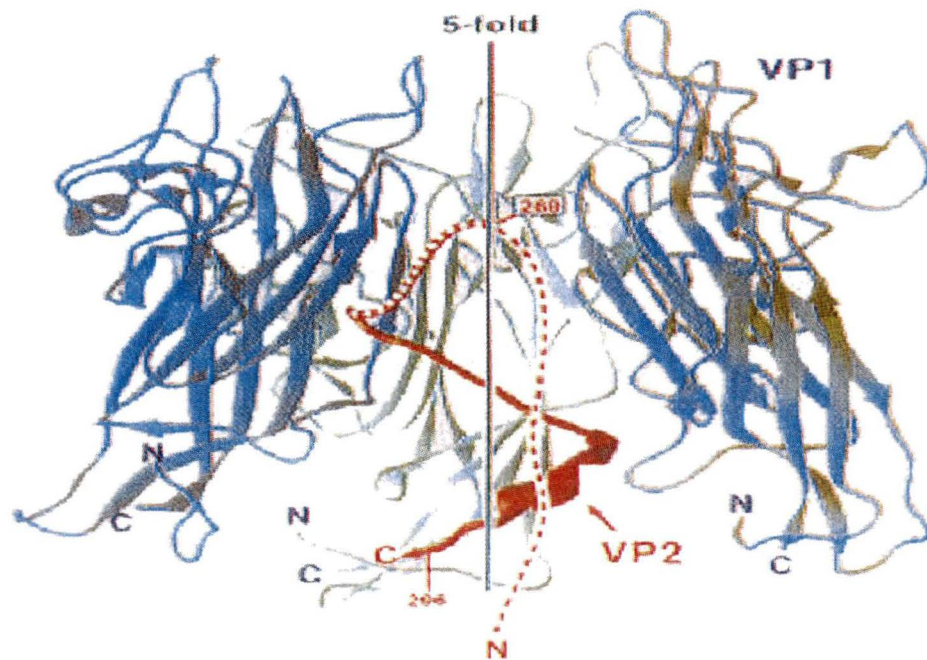
A. Interaction d'un pentamère de VP1 et la protéine mineure VP2 (Chen et al, 1998)

Cette illustration représente la structure de l'interaction entre un pentamère de VP1 et de la protéine VP2. La protéine mineure est représenté dans ce schéma par la molécule en rouge alors que les molécules (3) en bleu et vert représentent un monomère de VP1. Les deux autres monomères de VP1 ne sont pas représentées car ils nous empêcheraient de bien voir l'interaction entre les deux protéines qui est à l'intérieur du pentamère de VP1. Il est important de mentionner que VP2 et aussi VP3 interagissent seulement avec un des cinq monomères de VP1.

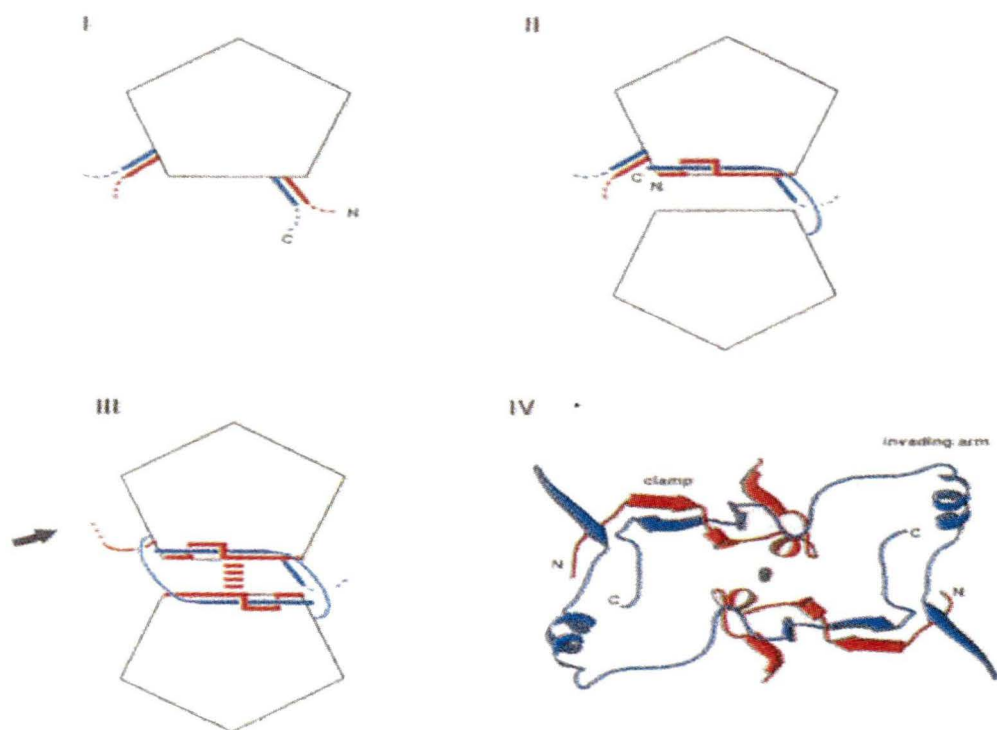
B. Modèle représentant la liaison des pentamères lors de la formation de la capside

L'illustration #1 représente un pentamère libre de VP1. Lors de l'assemblage de la capside, un pentamère envahit un autre pentamère par son extrémité C-terminal (illustration #2). Il aura liaison et formation d'un « clamp » par l'extrémité C-terminal et N-terminal des deux pentamères (illustration #3). Pour représenter cette liaison, l'illustration #4 qui est un modèle fait avec des rubans nous permet de bien visualiser l'interaction entre les deux pentamères.

A



B



et 72 copies de VP2 et/ou VP3 (5 copies de VP1 pour chaque copie des deux autres protéines, d'où les termes protéines majeure et mineures). Il a été démontré que VP1 avait la capacité de former une capside même en l'absence de VP2 et de VP3 (Salunke et *al.*, 1986; Montross et *al.*, 1991). Ces deux dernières protéines sont cependant indispensables à la formation du virion ou virus infectieux (Sahli et *al.*, 1993). Après la maturation, il y a lyse de la cellule et libération des virions. Ceux-ci sont alors prêts à infecter de nouvelles cellules.

VP1 et la distribution des nucléosomes

Beaucoup d'études ont été effectuées afin d'observer comment l'assemblage et la maturation du Py s'accomplissaient. La première hypothèse considérée propose que la capside s'assemblerait afin de former une capside vide, l'ADN entrant ensuite à l'intérieur de celle-ci comme c'est le cas pour certains bactériophages (Ozer et Tegtmeyer, 1972; Tan et Sokol, 1974). Toutefois, après quelques années, il a été démontré que cette hypothèse n'était pas valide. En fait, il semblerait que les protéines structurales s'assembleraient progressivement autour du minichromosome afin de former la capside (Fernandez-Munoz et *al.*, 1979; Garber et *al.*, 1978; Jakobovitz et Aloni, 1980). De plus, lors de l'assemblage et de la maturation, il y aurait perte de l'histone H1 (Coca-Prados et Hsu, 1979) ainsi qu'une acétylation croissante des histones nucléosomales du virus

(LaBella et Vesco, 1980; Coca-Prados et *al.*, 1980). Chez Py trois formes d'intermédiaires nucléoprotéiques ont été clairement identifiées lors de l'assemblage soit le minichromosome de 75S, un complexe réplcatif de 95S et le virion de 240S (Garcea et Benjamin, 1983). Ces formes du Py et aussi ceux de SV40 ont été analysées par plusieurs groupes de chercheurs et ont donné lieu à des observations. Brady et *al.* (1981) ont découvert que le minichromosome de SV40 (75S) était sensible à la digestion par *Bgl II* mais pas par *EcoRI* alors que celui du virion mature (240S) était sensible à *Bgl II* et à *EcoRI*. Ces observations indiquent que le minichromosome de SV40 subit des modifications conformationnelles lors de la maturation du virus. Aussi, il a été démontré, à l'aide de mutants de SV40 où l'initiation de l'assemblage de la capsid est inhibée, que la région de l'ADN viral proche de l'origine et des promoteurs était plus fréquemment sensible à la Dnase que chez le virus sauvage (Ambrose et *al.*, 1986). Ce phénomène a été aussi mis en évidence pour Py (Herbomel et *al.*, 1981). L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène est la suivante : VP1 aurait un rôle direct ou indirect dans la redistribution des nucléosomes du minichromosome viral afin que l'encapsidation puisse avoir lieu, ce qui explique la disparition de la région hypersensible lors de la maturation. Le travail de Blasquez et *al.* (1986) a permis de valider cette hypothèse. Ces chercheurs ont utilisé des souches mutantes de SV40 (mutants tsC) démontrant le même phénotype que les mutants décrits précédemment et

précisé la localisation des mutations responsables du phénotype ts (Behm *et al.*, 1988). Ainsi il a été établi que les mutations tsC se retrouvaient toutes sur la protéine VP1, à l'intérieur de la région 212-252 de la protéine. Donc VP1 est bien responsable de la redistribution des nucléosomes sur l'ADN viral qui précède et présumément autorise l'encapsulation de l'ADN viral.

VP1 et Ying-Yang1 (YY1)

Pour qu'il ait déplacement des nucléosomes sur l'ADN, les histones de celles-ci doivent être modifiées par des protéines régulatrices qui affaibliraient le lien ADN-nucléosome. Présentement, on connaît quelques modifications qui affaiblissent les liens entre les histones et l'ADN soit l'acétylation et la méthylation. Puisque la protéine VP1 semble être impliquée dans la redistribution des nucléosomes, on peut se demander si VP1 ne possède pas la capacité de recruter directement ou indirectement des acétylases ou encore des déacétylases. On ne connaît aucune étude jusqu'à ce jour qui a réussi à démontrer que VP1 possède la capacité de recruter par elle-même des enzymes ayant la capacité de modifier l'état des nucléosomes. Toutefois, une étude de Palková *et al.* (2000) a permis d'identifier une interaction entre VP1 et un facteur de transcription. Ce facteur est la protéine Ying-Yang1 (YY1). Palková *et al.* ont démontré par double-hybride et co-immunoprécipitation que VP1 et YY1 interagissent

ensemble. Puisque YY1 est capable de recruter les acétylases et les déacétylases (Shi et *al.*, 1997), YY1 pourrait donc être l'élément qui serait impliqué lors de la redistribution des nucléosomes qui semble induit par VP1. Palková et *al.* suggèrent que VP1-YY1 aurait un rôle au niveau de la transcription. Il est à noter que la protéine YY1 est capable de se fixer sur des séquences d'ADN spécifique et recruter des protéines qui pourraient influencer la transcription. En effet, il y a trois sites sur l'ADN viral du Py que YY1 reconnaît et lie. Deux de ces sites se retrouvent à proximité de la région régulatrice de la transcription. Les sites Y1 et Y2 sont situés près du promoteur tardif et de l'origine de réplication (Caruzo et *al.*, 1990; Hirano et Iwakura, 1990). De plus, lorsqu'on mute un de ces deux sites on affecte la transcription tardive du virus (Martelli et *al.*, 1996). Le troisième site, ou encore Y3, est situé à l'intérieur de la séquence codante de VP1 (Gendron et *al.*, 1996). Dans notre laboratoire, il a été démontré que lorsque le site Y3 est modifié la recombinaison de l'ADN viral est affectée. Cependant, il n'est pas clair si VP1 joue effectivement un rôle dans la transcription de l'ADN viral, celle des gènes tardifs en particulier, même si quelques publications ont déjà paru sur ce sujet (Garcia et *al.*, 2000; Mezes et Amati, 1994).

VP1 et le cycle lytique du virus du polyome

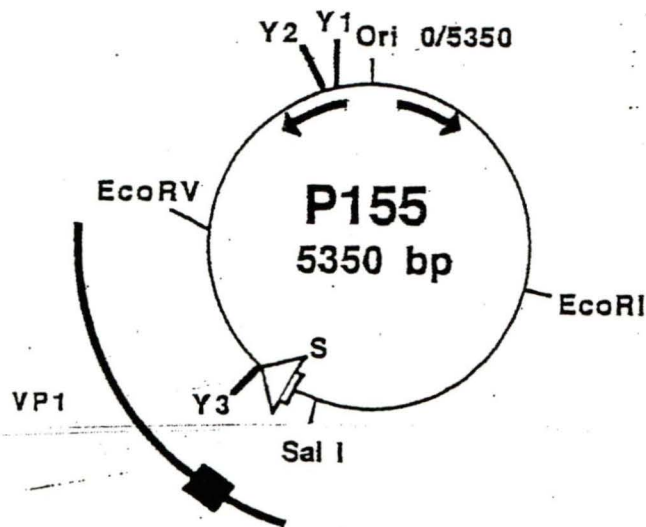
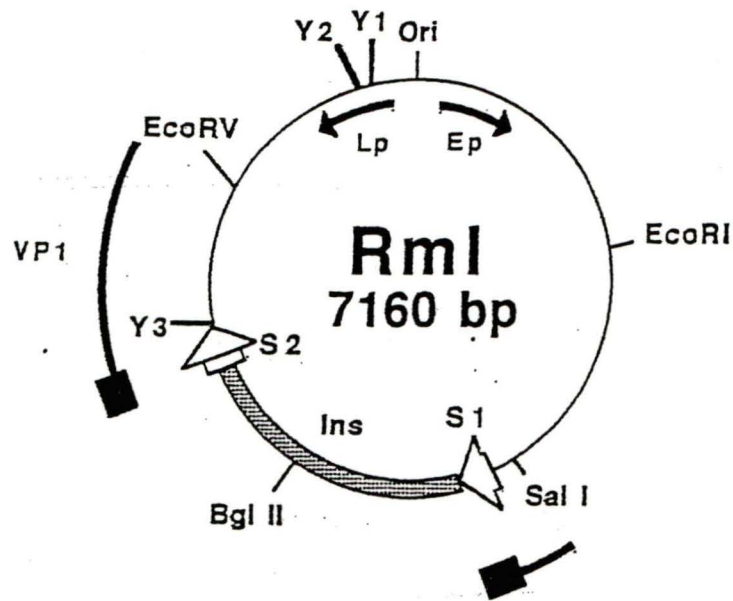
L'origine de notre projet découle de travaux décrits dans la littérature ainsi que de résultats obtenus dans notre laboratoire. Tout d'abord, Haynes II et *al.*, 1993 ont démontré qu'un mutant de Py chez lequel l'Asp 265 de VP1 est remplacé par un Ala était incapable de donner naissance à des virions alors que l'expression des fonctions virales précoces et tardives apparaissait normale. Néanmoins, la relation entre la mutation de VP1 et le phénotype observé n'avait pu être précisée. Dans notre laboratoire, la même mutation a été introduite non pas dans Py mais dans RmI (Gendron et *al.*, 1996; figure 4). RmI est une molécule hybride circulaire qui provient de cellules Cyp où l'ADN du Py s'est excisé du génome de l'hôte. RmI correspond à 1.03 copie de l'ADN du Py interrompu au nucléotide 3273 par une insertion de 1628 pb d'ADN génomique de souris (Ins). Situées de chaque côté de l'Ins, des répétitions virales de 182 pb constituent des sites recombino-gènes importants. Cette molécule possède la capacité de reformer un ADN fonctionnel de Py par l'excision de l'ADN génomique (Sylla et *al.*, 1980, 1984; figure 4). Il a été noté que cette mutation d'Asp 265 en Ala 265 de RmI affectait sa conversion en Py (Gendron et *al.*, 1996). Il semblait peu plausible que la recombinaison de RmI puisse dépendre d'une fonction véhiculée par VP1 et impliquée dans l'encapsidation du génome, d'autant que RmI dirige la synthèse d'une protéine affectée à VP1 mais non celle de VP1 elle-même

(Bélanger et *al.*, 2001). La question se posait donc de savoir quelle autre fonction que l'encapsidation VP1 pouvait-elle éventuellement assumer au cours du cycle.

Ainsi donc, mon projet était de préciser le phénotype des trois mutants P155 VP1 Glu 265, P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 His 265. La caractérisation effectuée comprend la mise en évidence des protéines virales tardives, des ARNm viraux tardifs et précoces, de l'ADN viral et du patron d'acétylation des complexes nucléoprotéiques viraux. Cette caractérisation a permis de démontrer que la protéine VP1 joue un rôle dans l'activation de l'expression des gènes tardifs (« early to late switch »). Nous discuterons comment VP1 pourrait réaliser une telle activation.

Figure 4. Conversion de RmI en P155

RmI est une molécule circulaire de 7.1 kb composée de 1.03 copies d'ADN de Py et de 1628 pb d'ADN de souris (Ins) inséré dans la région codante de VP1 du génome de Py. Des répétitions virales directes de 182 pb (situées à 3092 et 3273 pb) de la séquence codante pour VP1 se trouve de part et d'autre de l'Ins (répétition S1 et S2, tête de flèche). RmI comprend une région codante précoce complète, ininterrompue et se convertit en ADN de Py (P155) de longueur unitaire via une recombinaison intramoléculaire entre les répétitions S. Sur cette figure, on retrouve aussi les sites de liaison pour YY1 (Y1, Y2 et Y3).



Matériel et méthodes

1. Cellules

On utilise une lignée cellulaire permissive pour le virus Py afin d'effectuer nos transfections : les ScopT₁, fibroblastes de souris transformés. Cette lignée est dérivée de cellules C127 et produit de façon constitutive les protéines précoces de Py (Rautmann et al, 1982). Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sontensemencées dans des pétris de 100 mm dans du milieu DMEM (Dulbecco et Freeman, 1959) additionné de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) et de 1% (v/v) de fongizone. Ces pétris sont ensuite incubés à 37°C en présence de 10% CO₂.

Préparation de l'ADN avant la transfection

Les molécules de type P155 sont clonées dans un vecteur plasmidique pNN (figure 5) dérivé de pBR322. Avant de transférer ces ADNs dans les cellules ScopT₁, le vecteur pNN est séparé de l'ADN viral par l'utilisation de l'enzyme *Sall* (site de clonage). Par la suite, l'ADN digéré est dilué à 10 ug/ml et les fragments sont circularisés par ligation avec la T4 ADN ligase (USB). Le produit de la ligation est directement utilisé pour les transfections.

Transfection au DEAE-dextran

Les cellules ScopT₁ sont transfectées à une confluence de 50-70% selon la méthode de Sussman et Milman (1984). Trois modifications ont été apportées au protocole publié :

- 1) Le DEAE-dextran utilisé a un poids moléculaire de 500 000.
- 2) Le DMEM est tamponné avec du Tris 0.05 M pH 7.0.
- 3) Une seule période de 3 heures d'incubation à 10% CO₂ précède le choc au DMSO.

Pour chaque boîte de pétri de 100 mm, on utilise 1 ou 2 ug d'ADN viral (exclusion faite des séquences pNN).

Après le choc, les cellules transfectées sont généralement incubées à 37°C dans du DMEM additionné de 7.5% (v/v) de SVF, dans une atmosphère contenant 10% de CO₂, pendant un à cinq jours avant la récolte (voir Résultats et légendes des figures). L'analyse faisant suite à la récolte concerne soit les protéines virales, soit l'ADN viral, soit l'ARN viral, soit les nucléoprotéines virales ou le virus lui-même.

Analyses des protéines virales tardives

Extraction des particules agglutinantes

Les complexes nucléoprotéiques (virions et précurseurs incluant des protéines virales structurales) sont extraits des cellules. Tout d'abord, le milieu contenant les cellules est acidifié afin de favoriser l'interaction de la protéine VP1 avec les récepteurs cellulaires. Par la suite, on effectue 3 cycles de congélation-décongélation. Les extraits sont alors soumis à un traitement RDE (« receptor destroying enzyme ») à 37°C avec 2×10^{-5} unité/ul de neuraminidase de *Vibrio cholerae* de Sigma selon la méthode de Crawford (1962); Bourgaux (1964). La quantité des complexes est évaluée par la mesure de l'activité hémagglutinante sur des globules rouges de cobaye (Crawford, 1969 ; Bourgaux, 1964). Dans le cas de stocks de virus obtenus par passages en série, une unité d'hémagglutination (HAU) équivaut à 10^5 « plaque forming unit » (PFU) de virus.

Extraction des protéines totales

Cette extraction permet de récupérer toutes les protéines virales à l'intérieur de la cellule. Après une incubation de 1 à 5 jours à 37°C dans une atmosphère de 10% CO₂, les pétris contenant les tapis cellulaires sont placés sur glace et rincés deux fois avec du PBS A (NaCl 137mM, KCl

2.7mM, NaHPO₄ 10mM, KHPO₄ 1.8mM) froid (+4°C). Toujours sur la glace, on ajoute, par pétri de 100 mm, 1 ml du tampon de lyse RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1% (v/v), DOC.Na 0.5% (w/v), SDS 0.1% (w/v), Tris 50mM pH 7.5) additionné d'anti-protéases (Aprotinine 2 ug/ml, PMSF 1mM, leupeptine 10uM) et on incube 20 minutes. Ensuite, avec un « policeman » on récolte le contenu du pétri dans un tube d'ependorf de 1.5 ml. Les échantillons sont centrifugés 2 minutes dans une minicentrifugeuse à vitesse maximale afin de sédimenter les fragments cellulaires. On récolte le surnageant qu'on congèle à -20°C jusqu'à l'utilisation.

Immunobuvardage

Développée par Towbin et al. (1979) ainsi que Burnette (1981), cette technique a été adaptée à nos besoins. À 10 ul des échantillons protéiques provenant de la lyse cellulaire ou à des extraits de particules agglutinantes, on ajoute un volume égal (10 ul) de tampon de dépôt 2X (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, SDS 5% (w/v), Glycérol 20% (v/v), Bleu de bromophénol 0.2% (w/v), β-mercaptoéthanol 10% (v/v)). On chauffe les échantillons dans un bain à 100°C pendant 3 minutes. Les échantillons sont alors mis sur la glace jusqu'au moment où on les dépose sur gel SDS/acrylamide de 10% (w/v) immergé dans le tampon d'électrophorèse (Tris 25mM, Glycine 250 mM, SDS 0.1% (w/v)). L'appareil utilisé pour

effectuer les électrophorèses est le Hoefer mini-VE *Vertical Electrophoresis System* (Amersham, Pharmacia, biotech). Après la migration, on procède au transfert des échantillons contenus dans le gel vers une membrane PVDF (Hybond-P RPNF-L, Amersham Pharmacia Biotech). Le transfert submergé s'effectue à 300mA, 1 heure pour les gels d'acrylamide de 10% (w/v) et 2 heures pour les gels d'acrylamide de 15% (w/v), avec un appareil Hoefer mini-VE *Blot module* (Amersham Pharmacia Biotech) et dans un tampon Tris/Glycine/méthanol (Tris-HCl 25mM, Glycine 200mM, méthanol 20% (v/v)). La membrane, après un blocage d'une heure à température pièce ou 16 heures à 4°C avec 5% (w/v) de lait écrémé dans le tampon TBS-T (Tris 20mM pH 7.6, NaCl 137mM, Tween-20 0.5% (v/v)), est mise en contact pendant 1 heure à la température pièce ou à 4°C pendant une nuit avec un sérum anti-VP1 (dilution 1/2000) produit par notre laboratoire ou avec un sérum anti-VP2/VP3 (dilution 1/500) fourni gracieusement par le Dr Richard Consigli. Il est important de noter que les anticorps sont dilués dans le tampon de blocage TBS-T additionné de lait écrémé 5% (w/v). Après trois lavages de 10 minutes de la membrane dans le TBS-T on procède à la deuxième réaction de liaison avec un anticorps anti IgG de lapin couplé à la HRP (*anti-rabbit Ig* NA934, Amersham). Après une incubation d'une heure, la membrane est encore lavée trois fois avec le TBS-T et les

complexes anticorps primaires et secondaires – HRP sont révélés par chemiluminescence avec du ECL + (Amersham).

Infection

À partir des cellules ScopT₁ de confluence variant entre 50-70%, on infecte avec 1 PFU/cellule (soit 10 HAU/10⁶ cellules) de l'extrait (RDE) dont on connaît le titre. Après une heure d'adsorption à 37°C, on ajoute du milieu additionné de 7.5% SVF (v/v). L'incubation se poursuit à 37°C / 10% CO₂ jusqu'à 5 jours. Ensuite, on effectue l'extraction du virus par RDE et le titrage des HAU.

Caractérisation de l'ADN viral

Extraction de l'ADN de faible poids moléculaire

L'ADN de faible poids moléculaire est extrait des cellules selon la technique décrite par Hirt (1967). Après la centrifugation du lysat cellulaire, on récupère le surnageant qu'on dilue quatre fois avec de l'eau bidistillée nanopure. On effectue sur les extraits dilués un traitement avec la *RNase* (200 ug/ml) pendant 30 minutes à 37°C et ensuite, on traite avec la *protéinase K* (0.5 mg/ml) pendant 1 heure à 37°C. Après ces digestions enzymatiques, on fait successivement une extraction au phénol, une extraction phénol:chloroforme (1:1) et une extraction au chloroforme.

L'ADN contenu dans la dernière phase aqueuse obtenue est précipité à l'éthanol, séché à l'air et dissout dans du TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0) à raison de 40 ul par pétri.

Dix microlitres sont alors soumis à un traitement enzymatique précédant la migration sur gel d'agarose. La digestion enzymatique s'effectue à l'aide d'une endonucléase de restriction introduisant une ou deux coupures dans l'ADN viral (voir Résultat et légendes des figures), en présence de 10 ug de *RNase* et de l'endonucléase de restriction *DpnI*. *DpnI* est utilisé pour cliver l'ADN méthylé dans *E.coli* par l'activité *damI*. Ainsi, l'ADN d'origine bactérienne introduit dans la cellule par transfection sera fragmenté, mais pas l'ADN viral qui est dérivé de la réplication dans la cellules Scopt₁ (pNN est incapable de se répliquer dans une cellule eucaryote).

Analyse des fragments d'ADN par buvardage de type Southern

L'ADN digéré par des endonucléases de restriction est déposé sur gel d'agarose 1% (w/v) (ne contenant pas de bromure d'éthidium). Une fois séparé par électrophorèse, l'ADN est transféré sur une membrane de nylon *Hybond-N⁺* (Amersham) à l'aide de l'appareil *LKB VacuGene* (Pharmacia/LKB n°2016) qui effectue un vide équivalent à 50 cm H₂O. Le transfert alcalin utilisé ici s'effectue en trois étapes :

- 1) Dépuration de l'ADN pendant 20 minutes avec une solution d'HCl 0.25N.
- 2) Dénaturation de l'ADN durant 1 heure en utilisant une solution contenant du NaCl 1.5M et du NaOH 0.5N.
- 3) Lorsque le transfert est terminé, neutralisation de la membrane pendant 1 minute dans une solution de SSC 5X (NaCl 0.75M et citrate de sodium 0.075M)

Préhybridation et hybridation

La préhybridation et l'hybridation des membranes de nylon avec une sonde radioactive s'effectuent selon la technique de van der Ploeg et Flavell (1980), en tenant compte des modifications apportées par Chartrand et al. (1981). Lorsque l'hybridation est terminée, les membranes sont lavées deux fois avec du SSC 2X contenant 0.1% SDS (w/v), à 68°C pendant 30 minutes. Deux autres lavages de 30 minutes sont ensuite effectués avec du SSC 2X sans SDS.

Les filtres sont alors enveloppés de papier cellophane avant l'exposition à -80°C avec les films *HyperfilmTM-MP* (Amersham) entre deux écrans

intensifiants (Cronex par Speed, Dupont). Les autoradiogrammes sont développés à l'aide d'un appareil Kodak RP X-OMAT Processor.

Marquage de l'ADN *in vitro*

La technique employée pour marquer les fragments d'ADNdb au [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP de Perkin est celle décrite par Feinberg et Vogelstein (1983). Nous utilisons la trousse *Random Labelling* d'Amersham (RPN 1601Y) selon le protocole fourni avec la trousse. L'activité spécifique de la sonde est déterminée par la précipitation d'un aliquot sur un filtre Whatman GF/A avec de l'acide trichloroacétique à 10% (w/v), suivie d'un rinçage à l'éthanol 95%. Le comptage s'effectue dans du liquide à scintillation EcolumeTM (ICN) à l'aide d'un compteur à scintillation Wallac de Perkin. On obtient généralement une activité spécifique de l'ordre de 5×10^8 cpm/ug d'ADN. La sonde est dénaturée avec 1/10 volume de NaOH 1N et est ajoutée à 20 ml de la solution de préhybridation.

Avant de faire migrer les gels, on ajoute également une échelle 1 kpb (Gibco BRL, Life Technologies) radioactive comme marqueur de taille moléculaire. L'échelle froide ne peut être reconnue par nos sondes, il est donc essentiel de la marquer pour la détecter sur l'autoradiogramme. On effectue donc un remplissage des bouts cohésifs par la *Klenow*. Le mélange réactionnel contient les quatre deoxynucléotides triphosphates,

dont seule la deoxycytidine triphosphate (CTP) est marquée en α par du ^{32}P . On dépose habituellement dans le puit une quantité du mélange marqué qui correspond à 4×10^4 cpm, ce qui est suffisant pour être détectée après moins de 5 heures d'autoradiographie.

Caractérisation de l'ARNm viral

Extraction de l'ARN

On procède à l'extraction de l'ARN total des cellules transfectées en utilisant le Trizol (Invitrogen). Cette méthode est une version améliorée de celle de Chomczynski et Sacchi (1987). Quatre ml de Trizol sont ajoutés par pétri de 100 mm. Les cellules sont alors décollées à l'aide d'un « cell scraper » (Sarstedt) et le mélange est transféré dans des tubes 15 ml (Sarstedt). Pour le reste de la procédure, on a utilisé le protocole fourni avec le Trizol. Les extraits sont incubés 5 minutes à la température pièce afin d'obtenir une dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. Pour séparer l'ARN des autres molécules, on ajoute du chloroforme dans nos extraits, on centrifuge, on conserve la phase aqueuse puis on la précipite avec de l'isopropanol.

Analyse de l'ARNm par buvardage de type Northern

Il est important de mentionner que toutes solutions utilisées pour le Northern Blot ont été préparées avec de l'eau traitée au DEPC. L'ARN total quantifié par spectrophotomètre à 260 nm est déposé sur gel d'agarose 1% (w/v) contenant de la formaldéhyde (1% (v/v)). Après l'électrophorèse, l'ARN est transféré sur une membrane de nylon *Hybond N+* (Amersham) par capillarité (Southern, 1975). Le tampon SSPE 10X (NaCl 1.5M, NaH₂PO₄·H₂O 0.1M, EDTA 0.01M, pH 7.4) est la solution utilisée pour le transfert. Lorsque le transfert est terminé, l'ARN est fixé de façon covalente sur la membrane en exposant celle-ci aux UV (2 minutes chaque côté) et en la cuisant 30 minutes à 95°C. Avant d'hybrider la membrane, celle-ci est colorée au bleu de méthylène pour visualiser les endroits où se retrouvent les ARN ribosomaux (sert de repère). La membrane est ensuite nettoyée avec de l'eau bidistillée.

Préhybridation et hybridation

La préhybridation et l'hybridation des Northern Blot s'effectuent sensiblement de la même façon que la méthode décrite précédemment avec le Southern Blot (voir Caractérisation de l'ADN, préhybridation et hybridation) à ces exceptions près : on utilise le tampon SET 4X au lieu du tampon SSC 2X, la préhybridation et l'hybridation s'effectuent à 55°C, et les membranes sont rincées deux fois avec du SET 4X (NaCl 0.6M, EDTA

0.008M, Tris-HCl 0.12M pH 8.0) incluant 0.1% SDS (w/v) puis, elles sont lavées deux fois avec la même solution à 55°C (30 minutes par lavage).

Marquage de l'ADN *in vitro*

Les sondes utilisées pour marquer les ARNm sont produites à partir d'ADN complémentaire aux séquences des ARNm visés. La technique utilisée pour marquer cet ADN est semblable à celle déjà utilisée pour les Southern Blot (voir Caractérisation de l'ADN, Marquage de l'ADN). Le seul changement apporté est le suivant : la sonde est dénaturée par la chaleur, en la chauffant 3 minutes à 90°C au lieu de la dénaturer par du NaOH. Ensuite, elle est ajoutée à la solution de préhybridation.

Caractérisation de l'acétylation des complexes nucléoprotéiques viraux

Traitement à la formaldéhyde (cross-linking)

Après l'incubation post-transfection des cellules ScopT₁, on ajoute 1 ml d'une solution de formaldéhyde (Formaldéhyde 11% (v/v), NaCl 0.1M, EGTA 0.5mM, EDTA 1mM, Tris-HCl 50mM pH 7.5) dans les pétris (Dedon et al., 1991). Ces pétris sont incubés 2 minutes à 37°C et mis sur la glace à la fin de l'incubation. Le milieu est enlevé et les cellules sont lavées trois fois avec du PBS A (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, NaHPO₄

10mM, KHPO_4 1.8mM) froid (4°C). Les complexes sont extraits après cette étape.

Extraction des particules agglutinantes

L'extraction des complexes nucléoprotéiques s'effectue avec la technique décrite dans la partie « Analyse protéique », à la section « extraction des particules agglutinantes ».

Ultracentrifugation

Cette méthode, permet de purifier les complexes viraux soient les virions (240S) et les minichromosomes viraux (75S) tout en évitant la contamination des protéines libres dont les histones cellulaires. La méthode utilisée consiste à former un gradient discontinu de saccharose 20% (w/v) dans des tubes de 5 ml. 1 ml des extraits protéiques traités à la formaldéhyde est délicatement déposé à la surface de 3 ml de la solution de saccharose 20%. Les gradients sont centrifugés à 4°C pendant 7 heures à 30000 g. L'ultracentrifugation se fait dans une centrifugeuse de modèle L8-M de Beckman avec un rotor SW 50.1.

Immunobuvardage

La procédure utilisée est décrite dans la partie « Analyse protéiques », à la section « immunobuvardage ». Les anticorps utilisés sont l'anti-H4 penta et l'anti-H2B de la compagnie Upstate.

Extraction de l'ADN des complexes viraux

L'ADN des complexes est extrait à partir des culots obtenus par ultracentrifugation. Après avoir resuspendu le culot dans du 40 ul de Tris-EDTA pH 8.8, on prend 10 ul pour l'extraction. Ensuite, on dilue ce 10 ul à 200 ul de TE (Tris 10mM pH 7.8, EDTA 1mM) additionné de SDS et de NaCl (SDS 0.5% (w/v), NaCl 0.15M). Par la suite, les extraits dilués sont chauffés à 80°C pendant 1 heure. À la fin de l'incubation, on digère les extraits avec la protéinase K (250 ug/ml) durant toute la nuit. Le lendemain, on ajoute 1 ug d'ADN contrôle (dans notre cas c'est le vecteur pNN) à tous les tubes afin d'entraîner l'ADN lors des traitements subséquents au phénol, phénol-chloroforme et chloroforme. L'ADN est précipité avec de l'isopropanol et par la suite séché. Il est finalement resuspendu avec 10 ul de TE.

Buvardage d'ADN (Southern Blot)

Le Southern Blot est fait de la même façon que celui décrit précédemment (voir caractérisation de l'ADN dans Matériel et méthodes).

Construction des ADN plasmidiques

Le texte qui suit a trait à des matériaux mis à la disposition de l'auteur de ce mémoire, mais non créés par lui. Il a pour but de préciser l'origine de constructions essentielles aux résultats rapportés ici.

Vecteur plasmidique pNN

pNN

Le vecteur pNN provient du vecteur pBR322 qui a subi plusieurs modifications moléculaires. Tout d'abord, il y a délétion d'un fragment de 704 pb soit du nt 1648 à 2352 (Bolivar et al., 1977) qui permet de générer un tout nouveau vecteur de 3657 pb, soit pAT153 (Twigg et Sherratt, 1980). Par la suite, il y a délétion des nucléotides allant de 4348 à 573 passant par le site *EcoRI* (4363/1) ce qui permet d'éliminer chez le vecteur pAT153 quelques sites de restrictions et inactiver le gène de résistance à la tétracycline. Ces modifications donnent lieu à la molécule nommée pNN (Gendron et al., 1996) (Figure 5).

Plasmides recombinants

pNNRtsP155

P155 est un mutant thermosensible de la souche P16 du Py. L'ADN de P155, contrairement à la souche A2, possède une délétion à l'intérieur de la région codante de MT et LT allant des nucléotides 1348 à 1359

(Gélinas et al., 1982) et aussi, une mutation (G→C) au nucléotide 2658 rendant LT thermosensible (Gendron et al., 1988). Cette thermosensibilité de LT affecte la croissance du virus en fonction du temps puisque la culture doit être incubée à 33°C. La molécule RtsP155 est en fait un révertant de cette mutation à 2658, ce qui redonne un caractère sauvage (wild-type) qui lui permet de croître à 37°C. Elle a été isolée d'une culture de cellules Cyp-C13 dont la croissance était maintenue à 39°C (Delbecchi et al., 1981). L'amplification bactérienne de RtsP155 est assurée par le plasmide pNN inséré au site *Sall* (2962) (voir figure 6).

Mutants P155 de la protéine VP1.

La génération de ces mutants P155 est assez simple quoique la procédure soit longue. Les mutations ont été introduites, à l'origine, dans les molécules RmI par la méthode de Baretino (1994). Le gène mutant de VP1 a été isolé et a été inséré dans le vecteur pBlueBac afin d'exprimer ces protéines mutées. Afin de voir l'effet de ces mutations sur le virus du polyome, les mutations ont été transférées du pBlueBac 4.5-VP1 vers la molécule pNNRtsP155.

PNNRtsP155 VP1 (Glu, Asn, His) 265

Pour la génération de ces molécules, il a fallu digérer deux vecteurs dont pBlueBac 4.5-VP1 (utilisé trois plasmides ayant VP1 Glu 265, VP1

Asn et VP1 His 265) et pNNRts P155. Le fragment *HindIII/SmaI* obtenu du vecteur pBlueBac 4.5-VP1 (ayant le fragment muté de VP1) est ligué de façon intermoléculaire avec le fragment obtenu par digestion *BamHI/HindIII* de pNNRts P155. Cette réaction donne lieu à la naissance de plusieurs fragments dont le fragment voulu de 1642 pb. Ensuite, ce mélange de fragments est ligué avec le vecteur pNNRtsP155 qui a été digéré précédemment par *BamHI/SmaI* et purifié. Le produit de la ligation est utilisé pour la transformation bactérienne. On sélectionne parmi toutes les souches obtenues celles qui possèdent le vecteur voulu en effectuant une digestion de l'ADN par *EcoRV/SalI*. L'ADN ayant le fragment complet avec la mutation vont générer deux fragments dont un de 1144 pb. Les souches qui génèrent ce fragment sont alors sélectionnées.

Figure 5. Carte physique des vecteurs plasmidiques

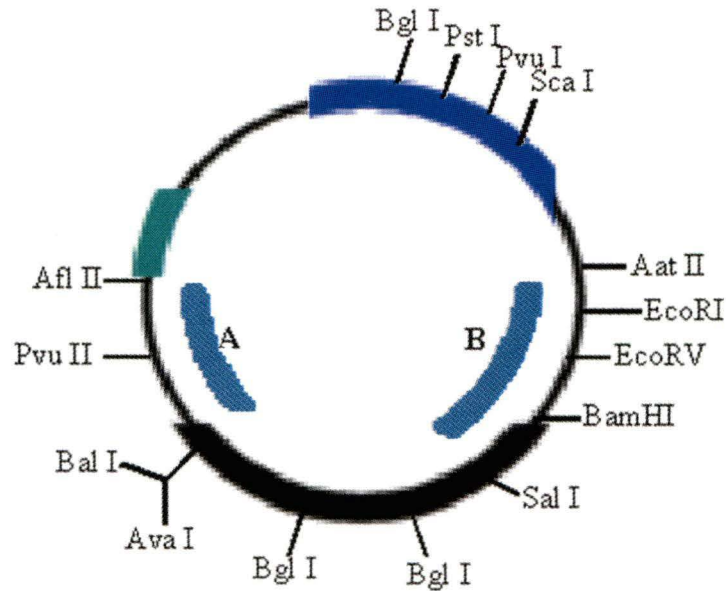
A. Carte physique de pBR322 (Bolivar et al., 1977)

Le vecteur pBR322 (4363 pb) est la molécule qui est utilisée afin de générer les vecteurs plasmidiques pAT153 et pNN. Sur cette molécule, on retrouve des gènes qui confèrent la résistance à l'ampicilline et à la tétracycline et ainsi qu'une multitude de sites permettant le clonage moléculaire. Pour obtenir la molécule pAT153, on délète la portion A (1648 à 2352) de pBR322 (Twigg et Sherrat, 1980). Par la suite, si la portion B est enlevé de pAT153 qui va des nt 4347 à 574 on génère la molécule pNN (Gendron et al, 1988).

B. Carte physique de pNN (Gendron et al., 1988)

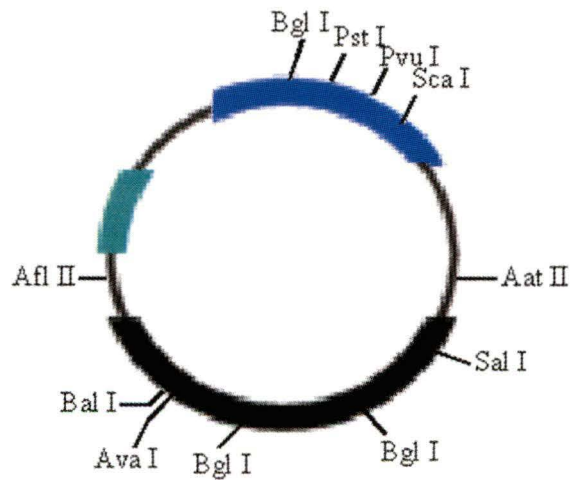
pNN est généré par un remaniement de la molécule de base pBR322 et est le vecteur plasmidique utilisé dans cette étude. La délétion effectuée sur la molécule pAT153 élimine une partie du gène à la tétracycline et quelques sites de restrictions importants tels que *EcoRI*, *EcoRV* et *BamHI*. L'insertion du vecteur pNN dans nos ADN viraux s'effectue au site *Sal I* ce qui leur confère une résistance à l'ampicilline et une excellente capacité de réplication dans les DH5 α .

A



Délétion effectuées
 pBR 322 délété de la partie A 1648 a 2352 : pAT 153 (3657 pb)
 pAT 153 délété de la partie B 4347 a 574 : pNN (3068 pb)

B

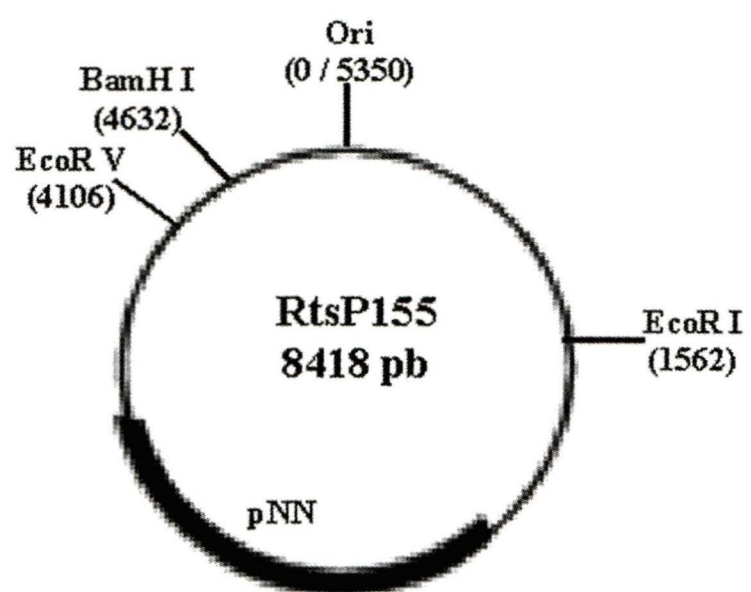


Légende

- Résistance à la tétracycline
- Résistance à l'ampicilline
- Origine de répliation
- Délétions

Figure 6. Carte physique de pNNRtsP155

La molécule pNNRtsP155 provient de l'insertion du vecteur plasmidique pNN au site *Sal I* de RtsP155. Les substitution du codon 265 ont été insérées directement dans la molécule pNNRtsP155. Le vecteur plasmidique pNN permet à pNNRtsP155, ainsi qu'aux constructions qui en dérivent, d'être sélectionné par leur résistance à l'ampicilline. Il est à noter que le vecteur pNN est excisé avant toutes transfections des constructions RtsP155 dans les cellules ScopT₁.



Résultats

Afin de préciser si, comme le suggèrent certains résultats de notre laboratoire (Bélanger et al., 2001), VP1 joue au niveau du cycle lytique, un rôle distinct de celui joué dans l'encapsidation, des mutations ponctuelles ont été introduites dans le codon 265 inclus dans la séquence codant de la protéine VP1 de la molécule RtsP155. Ces mutations se situent précisément aux nucléotides 3180-3182 de l'ADN viral. Une mutation de ce codon avait déjà été montrée capable d'affecter la recombinaison de RmI (P. Bourgaux, données non publiées). Ces substitutions entraînent le remplacement de l'acide aminé 265 de la protéine VP1 (un aspartate ou Asp dans la protéine sauvage) par un autre acide aminé (a.a). De plus, ces substitutions n'affectent pas le cadre de lecture du gène VP1. Donc, trois mutants ont été ainsi produits soit : P155 VP1 Glu 265, P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 His 265 (voir figure 7, A). En comparant les charges des chaînes latérales de l'a.a 265 des mutants à celui du virus sauvage on peut spéculer sur ce que devrait être le phénotype de ceux-ci (figure 7, B). Tout d'abord le mutant P155 VP1 Glu 265 devrait avoir le phénotype le plus proche de Rts P155 puisque la chaîne latérale de Glu a une charge négative qui diffère peu de celle de Asp, tandis que le mutant P155 VP1 His 265 aurait le phénotype le plus différent de celui du virus sauvage, puisque la chaîne latérale de His est différente de celle de Asp en structure et en charge. Enfin, pour le mutant P155 VP1 Asn 265, il est difficile de

prédire un phénotype, la chaîne latérale de Asn étant peu chargée. Pour vérifier l'effet réel de la substitution de l'a.a 265, nous avons caractérisé ces mutants en étudiant plusieurs éléments dont la présence des protéines virales tardives, les quantités d'ARNm et d'ADN présents dans les cellules et les complexes nucléoprotéiques viraux.

A) Cinétique d'accumulation de la protéine VP1, déterminée par hémagglutination.

Pour débiter l'analyse des mutants, nous avons employé une méthode simple et rapide qui nous permettrait de déterminer la quantité approximative de VP1 produite par chaque souche. Donc, les mutants P155 VP1 Glu 265, P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 His 265, ainsi que le type sauvage P155 VP1 Asp 265 (RtsP155) ont été transfectés dans les cellules ScopT₁. En fonction du temps (généralement un jour, trois jours et cinq jours) d'incubation à 37°C, la totalité des complexes nucléoprotéiques (virions et précurseurs incluant des protéines structurales) présents dans les cellules sont extraits selon la méthode de Crawford (1962) qui a recours à la neuraminidase, ou encore RDE (receptor-destroying enzyme) (Matériel et méthodes). Pour titrer le nombre

Figure 7. Le codon 265 de VP1 chez RtsP155 et nos mutants.

Mutations ponctuelles dans l'ADN

Ce schéma représente l'endroit où l'ADN a été modifié dans le gène de VP1 pour chaque mutant. La position est notée selon la numérotation nucléotidique du génome de RtsP155. De plus, sur le schéma on mentionne l'a.a. correspondant à la substitution. À noter les différences de structure et de charge entre les chaînes latérales de chaque a.a.

Les ADN utilisés dans notre étude

P155 Asp 265(wt) 3282- GAT -3280
Asp

P155 Glu 265 3282- GAA -3280
Glu

P155 Asn 265 3282- AAT -3280
Asn

P155 His 265 3282- CAT -3280
His

Caractéristiques des a.a. utilisés

Structure	Name	Abbreviation*	pK _{a1} (α-Carboxyl)	pK _{a2} (α-Amino)	pK _{a3} (side chain)	pI
Charged polar side chain						
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Aspartate	Asp (D)	2.1	9.8	3.9 (β-Carboxyl)	3.0
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}^- \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Glutamate	Glu (E)	2.2	9.7	4.3 (γ-Carboxyl)	3.2
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{HN} \quad \text{NH}^+ \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{H} \end{array}$	Histidine	His (H)	1.8	9.2	6.0 (Imidazole)	7.6
Neutral polar side chain						
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ ^-\text{OOC}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$	Asparagine	Asn (N)	2.0	8.8		5.4

de complexes obtenus, nous utilisons la technique d'hémagglutination qui est rapide et fiable. Elle nous renseigne sur la capacité du génome viral à produire des pentamères de VP1. Chaque pentamère de VP1 possède la même propriété hémagglutinante, qu'il soit associé à VP2 ou à VP3, ou même qu'une suspension de pentamères libres, de capsides, ou de virions (Garcea et al., 1987; Zullo et al., 1986). Les nucléoprotéines incluant VP1 se fixent sur des récepteurs présents sur les globules rouges de cobaye utilisés pour cette méthode. La technique consiste à utiliser la dilution limite (end-point dilution; Crawford, 1969; Bourgaux, 1964) où nous titrons les complexes nucléoprotéiques provenant des cellules extraites, dans une plaque de 96 puits. Nous ajoutons les globules rouges dans les puits pour ensuite incuber les plaques à hémagglutination pendant 2 heures à 4°C. La dernière dilution donnant une agglutination nous donne le titre en agglutinines.

La figure 8 permet de constater que le virus sauvage (RtsP155) et les trois mutants se comportent différemment pour ce qui est de la production du matériel hémagglutinant. La première observation évidente de la figure est la croissance exponentielle de RtsP155 vraisemblablement due à l'enclenchement du deuxième cycle de la réplication virale qui se produit à la troisième journée. Bien que le mutant P155 VP1 Asn 265 ne démontre pas une telle croissance exponentielle, il produit une quantité

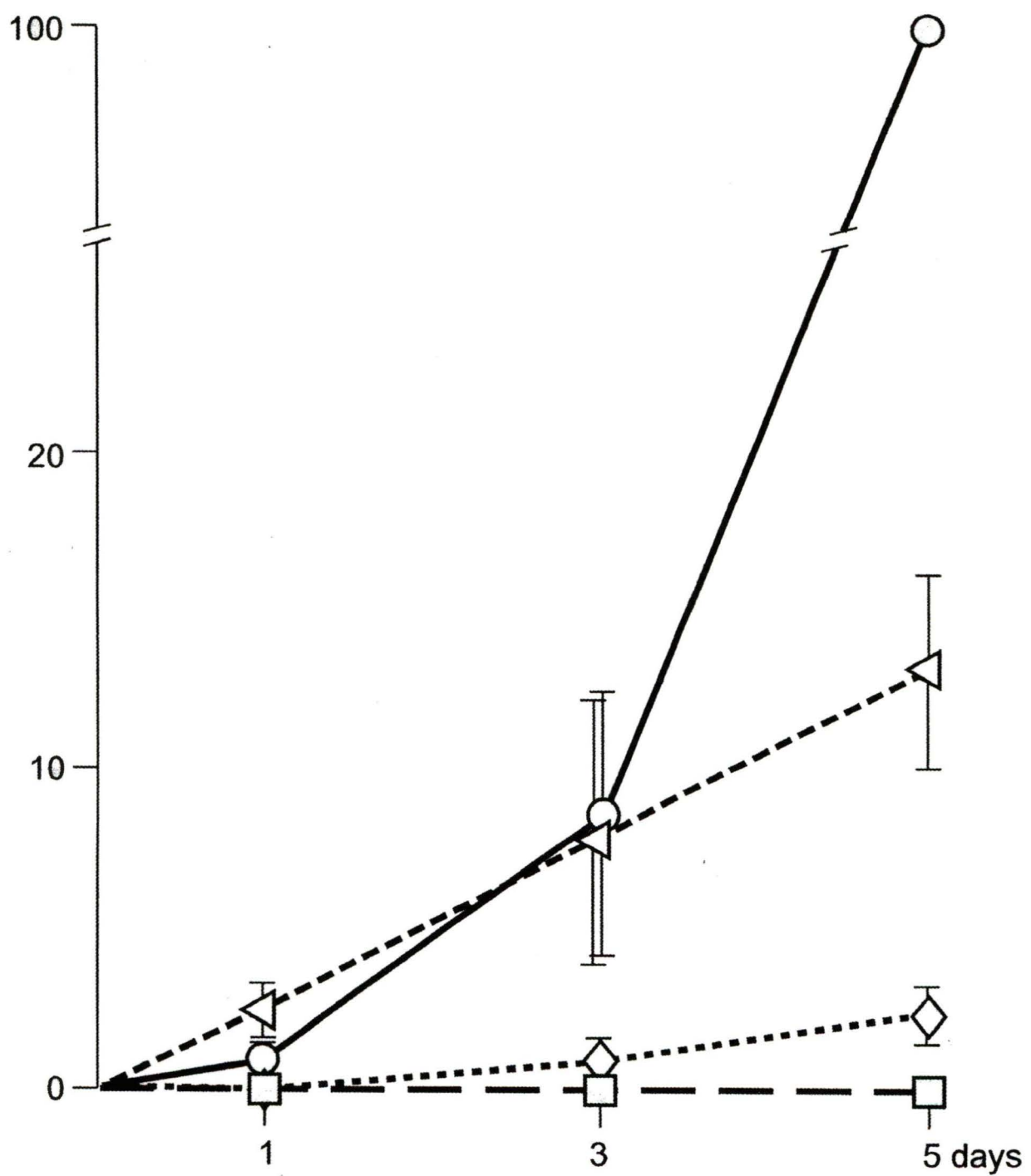
plus élevée d'HAU à des temps précoces (surtout à 24h et aussi à 48h pt) que le virus sauvage. Dans d'autres expériences non montrées ici, nous avons pu détecter des agglutinines virales dès 16h pt pour ce mutant alors que pour RtsP155 c'est à 19h pt que ces agglutinines devenaient détectables. P155 VP1 Glu 265 présente la situation inverse : celui-ci produit des agglutinines avec un retard très marqué par rapport au virus sauvage (environ 48h pt). Enfin, pour le mutant P155 VP1 His 265, nous ne détectons aucune agglutinine, même à 5 jours pt.

B) Détection des protéines tardives par immunobuvardage (Western Blot)

Afin d'investiguer la signification des résultats de l'hémagglutination, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage - communément appelée Western Blot (Towbin et al, 1979 ; Burnette, 1981) - qui nous renseigne sur la réactivité immunologiques des protéines impliquées. Pour ce faire, nous disposons de deux sérums de réactivités différentes. Le sérum anti-VP1 a été produit au laboratoire alors que le sérum anti-VP2/VP3 a été gracieusement fourni par le laboratoire du Dr. Richard Consigli. Ces deux sérums, contenant des anticorps polyclonaux, nous nous attendions à ce qu'ils mettent en évidence non seulement les protéines virales tardives intactes, mais également certains de leur produits

Figure 8. Analyse de la capacité des ADN viraux à produire du matériel hémagglutinant.

Nous avons transfecté les molécules RtsP155 (Py VP1 Asp 265), P155 VP1 Glu 265, P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 His 265 sur des monocouches de cellules ScopT-1. Après une incubation de 1, 3 ou 5 jours pt, les particules agglutinantes sont extraites des cellules par un traitement à la neuraminidase (RDE) (Crawford, 1962; Bourgaux, 1964). À la suite de ce traitement, ces particules sont titrées selon la méthode de dilution limite (« end-point dilution »; Crawford, 1969; Bourgaux, 1964). Les titres en HAU/ml ainsi obtenus sont par la suite convertis en pourcentage. Dans chaque expérience, le nombre de HAU/ml atteint par RtsP155 à 5 jours a été considéré comme 100%, et les autres titres ont été recalculés en conséquence. Ensuite, les moyennes ont été calculées. Les résultats présentés proviennent des moyennes de trois expériences. Les barres verticales sur le graphique représentent l'écart type. À l'examen du graphique, on note que le mutant P155 VP1 His 265 ne produit pas de matériel agglutinant alors que les deux autres mutants en produisent; par ailleurs le mutant P155 VP1 Asn 265 commence à accumuler des agglutinines plus précocement que le génome sauvage. Toutefois, au contraire de Py VP1 Asp 265, le matériel agglutinant ne croît pas de façon exponentielle à partir du 3^{ème} jour pt. On note que pour P155 VP1 Glu 265, il y a une production retardée d'agglutinine.



Légende

- Py VPI Asp 265 (WT)
- ...◇ Py VPI Glu 265
- - △ Py VPI Asn 265
- · - □ Py VPI His 265

de dégradation, au cas où ceux-ci auraient été présents en quantité appréciable dans nos extraits.

Pour cette étude nous avons utilisé des extraits RDE semblables ou identiques à ceux déjà utilisés pour les tests d'héماغglutination. La figure 9 montre les protéines détectées à un jour et cinq jours pt dans des cellules ScopT₁ transfectées par RtsP155 (piste Wt), P155 VP1 Glu 265 (piste Glu), P155 VP1 Asn 265 (piste Asn), et P155 VP1 His 265 (piste His).

L'utilisation des deux antisérums nous permet d'observer qu'il y a bien accumulation des protéines tardives, autant VP1 que VP2 et VP3, qui se développe parallèlement à celui des agglutinines. Aucun produit de dégradation n'est décelable, quelque soit le sérum utilisé. Par ce résultat, nous comprenons mieux que l'effet observé lors de la titration d'HAU est dû à une accumulation de la protéine VP1 (et secondairement des protéines VP2 et VP3) qui diffère pour chaque ADN transfecté. Donc en substituant le résidu 265 de la protéine VP1 par un autre, nous affectons l'accumulation de VP1, comme si VP1, par un mécanisme quelconque, contrôlait sa propre production ou accumulation. En effet, rien dans nos résultats ne nous permet de supposer que le phénotype de P155 VP1 Glu 265, et encore moins celui de P155 VP1 Asn 265, indique que les mutations déstabilisent VP1. Le cas de P155 VP1 His 265 est moins clair.

Ici, VP1 ne peut être détecté ou bien parce qu'il est instable, ou bien parce qu'il n'est pas extrait des cellules par la méthode utilisée; le premier cas serait compatible avec un contrôle positif, et le second à un contrôle négatif, de l'expression des gènes tardifs par VP1. Pour tenter de résoudre cette ambiguïté, nous avons utilisé une autre méthode pour extraire les protéines virales tardives soit l'extraction protéique totale. Même par cette méthode, nous avons échoué à détecter l'une des quelconques protéines tardives pour le mutant P155 VP1 His 265 (voir figure 9, B). Pour rendre compte de ce phénotype, nous avons supposé que la protéine VP1 His 265 est synthétisée mais dégradée trop rapidement pour s'accumuler de façon significative. Un précédent comme celui-ci a déjà été décrit pour VP1 de SV40 (Ozer et Tegtmeyer, 1972). Finalement, nous avons considéré la possibilité que chez P155 VP1 His 265, VP1 est bien synthétisée et accumulée mais non détectée par notre anticorps anti-VP1; cependant, ceci n'expliquerait pas pourquoi P155 VP1 His 265 semble incapable d'accumuler non seulement VP1, mais également VP2 et VP3.

C) Essais d'infections

Le fait que P155 VP1 Asn 265, qui accumule VP1 plus rapidement que RtsP155, atteint un plateau de production après trois jours pt pourrait indiquer une incapacité à produire des particules infectieuses. Afin de

Figure 9. Effet des mutations sur la production ou l'accumulation des protéines tardives.

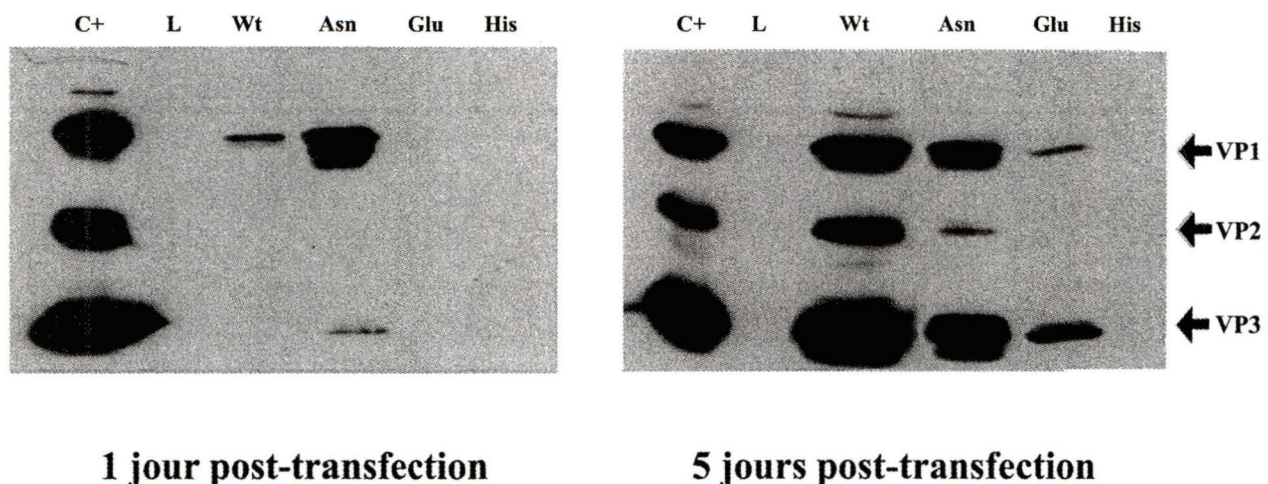
A. Analyse des mutants par immunobuvardage.

Les mutants P155 VP1 Glu 265 (piste Glu), P155 VP1 Asn 265 (piste Asn) et P155 VP1 His 265 (piste His), ainsi que le contrôle RtsP155 (piste wt), ont été transfectés dans les cellules ScopT₁. Après une incubation d'un jour et cinq jours à 37°C dans une atmosphère de 10% CO₂, les particules virales sont extraites des cellules par traitement au RDE et soumises à un immunobuvardage. L'image montrée a été obtenue après réaction avec le sérum anti-VP1, puis le sérum anti-VP2/VP3. Un marqueur de poids moléculaire est ajouté aux échantillons (piste L, *Rainbow marker*, Amersham). Aussi un extrait cellulaire infecté par des virus est également ajouté qui constitue notre contrôle positif (piste C+). À un jour, on détecte des protéines tardives virales seulement pour RtsP155 et P155 VP1 Asn 265, alors qu'à 5 jours, on détecte des protéines tardives pour toutes les souches exceptées P155 VP1 His 265.

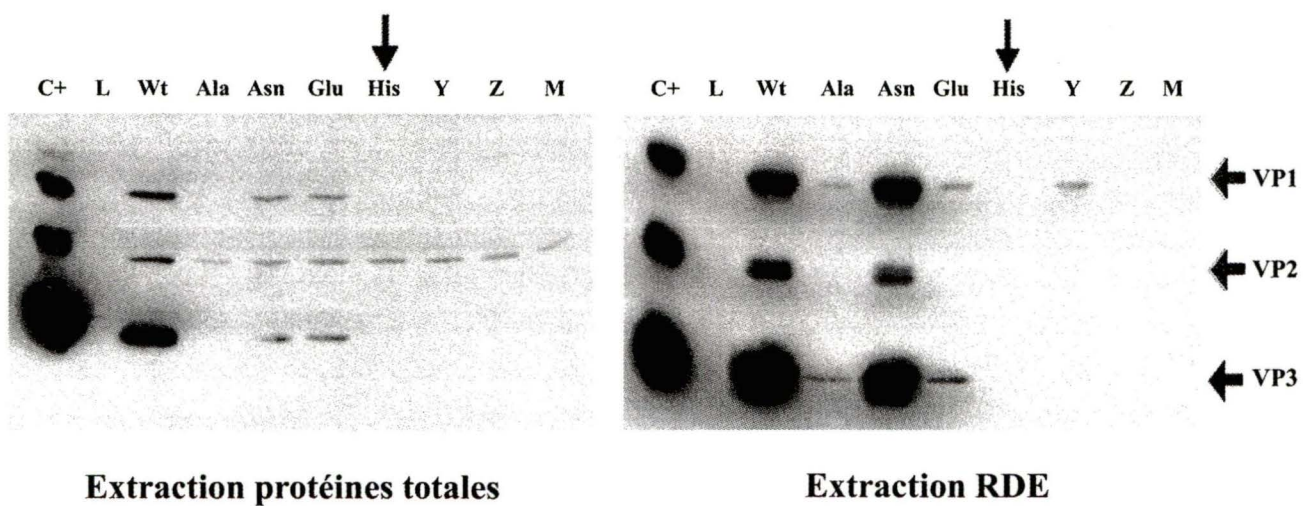
B. Immunobuvardage des mutants extraits par deux méthodes différentes.

Par ces figures, où on retrouve RtsP155 (wt), P155 VP1 Asn 265 (piste Asn), P155 VP1 His 265 (piste His), P155 VP1 Glu 265 (piste Glu), le contrôle positif (C+), le contrôle négatif (M) et trois autres échantillons qui n'ont pas fait l'objet d'une caractérisation complète dans cette étude (Ala, Y et Z), nous voulons démontrer que ce n'est pas la méthode d'extraction utilisée qui fait en sorte qu'on ne détecte pas de protéines chez le mutant P155 VP1 His 265. Ces ADN sont transfectés dans les cellules ScopT₁ et celles-ci sont incubées pendant 3 jours à 37°C. Par la suite, on extrait les protéines soit par extraction totale (gel de gauche) ou par extraction au RDE (gel de droite). Avec ces deux gels, on remarque que peu importe la méthode d'extraction utilisée, on ne détecte pas plus les protéines tardives pour le mutant P155 VP1 His 265.

A



B



vérifier cette hypothèse, nous avons effectué des essais d'infections avec les mutants et le virus sauvage. Ici, il est important de faire la différence entre transfection et infection. Lorsque nous transfectons les cellules, nous permettons à l'ADN de pénétrer à l'intérieur des cellules à l'aide d'un agent transfectant. Alors qu'une infection implique une interaction du virus et de la cellule pour que celui-ci pénètre la cellule et par la suite, se réplique. Dans le cas du virus du polyome, c'est la protéine VP1 qui permet la liaison entre le virus et les récepteurs de la membrane cellulaire ayant à leur extrémité de l'acide sialique. En effectuant une infection, nous pouvons déterminer si les mutants ont la capacité de produire des particules virales infectieuses.

À cette fin, nous utilisons les extraits RDE de 5 jours pt de chaque souche dont nous connaissons le titre en HAU. Nous utilisons une quantité identique de HAU produites par chaque ADN pour infecter les cellules sauf dans le cas du P155 VP1 His 265 où nous ajoutons un volume égal à celui de P155 VP1 Glu 265 (le plus bas en HAU détectable). Les cellules sont soumises à une extraction au RDE 5 jours après infection; nous déterminons à nouveau la quantité d'HAU pour chaque souche (figure 10, A). Les résultats de la titration sont, ensuite, confirmés par immunobuvardage (figure 10, B).

Tout d'abord, nous notons que seuls les extraits RDE des cellules transfectées par P155 VP1 Asp 265 et P155 VP1 Glu 265 contiennent un matériel capable de générer des HAU après infection, c'est-à-dire des virus infectieux. À l'opposé les extraits générés par P155 VP1 His 265 et même le mutant P155 VP1 Asn 265 ne produisent pas d'agglutinines après une infection. La figure 10B indique que seuls les extraits contenant des agglutinines contiennent également des protéines tardives. Après ces deux analyses, nous pouvons affirmer que seul le mutant P155 VP1 Glu 265 possède la capacité de produire des particules virales infectieuses. Ce résultat permet d'expliquer pourquoi les HAU produites par P155 VP1 Asn 265 ne croissent pas au même rythme que celles produites par le virus sauvage, particulièrement après le troisième jour pt.

D) Mise en évidence de l'ARNm tardif

La production de protéines tardives par P155 VP1 Asn 265 est clairement accélérée, et celle de P155 VP1 Glu 265 ralentie, par rapport à celle de RtsP155. Ce phénomène suggère l'existence d'une régulation de la production de la protéine VP1 par elle-même. Cependant, une telle régulation peut s'effectuer soit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel (maturation de l'ARNm), ou encore au niveau traductionnel. Pour explorer cette question, nous avons recherché les

ARNm viraux dans les cellules transfectées par nos mutants et nous les avons analysé par Northern Blot (Southern, 1975 ; Alwine et al., 1977). Cependant, il nous a paru important d'être à même de distinguer les ARNm des protéines tardives mineures de ceux codant pour la protéine VP1, raison pour laquelle nous avons eu recours à deux sondes (voir figure 11).

Dans des cellules infectées par le virus du polyome, l'ARNm de la protéine VP1 (mVP1) est 10 fois plus abondant que ceux codant pour VP2 ou VP3 (mVP2 ou mVP3). En conséquence, la sonde L1 met bien en évidence mVP1 mais est peu efficace pour les deux autres messagers. D'où l'utilité de la sonde L2/3 qui, correspondant principalement à des séquences provenant de l'intron soustrait à mVP1, favorise la mise en évidence de mVP2 et mVP3 par rapport à mVP1.

Que mVP2, mVP3 et mVP1 soient généralement désignés les messagers 19S, 18S et 16S indique clairement que ces espèces ont été caractérisées à l'origine grâce à l'ultracentrifugation et à un système de traduction in vitro. Les valeurs de 19S, 18S et 16S sont donc des moyennes approximatives. Par ailleurs, nous ne connaissons qu'un article présentant une analyse de la transcription tardive du virus du polyome par Northern, article incluant des résultats aisément conciliables avec les

Figure 10. Essais d'infection avec nos mutants.

Les mutants P155 VP1 Glu 265 (piste Glu), P155 VP1 Asn 265 (piste Asn) et P155 VP1 His 265 (piste His) et aussi le contrôle RtsP155 (piste Py) ont été transfectés sur des monocouches de cellules ScopT₁ qui ont été incubées pendant 5 jours à 37°C. Après l'incubation, nous récoltons les particules virales par un traitement au RDE. Par la suite, il y a titration de la concentration en HAU par la méthode de dilution limite (Matériel et méthodes; Crawford, 1962; Bourgaux, 1964). Selon les titres obtenus, nous infectons les cellules avec 10 HAU/10⁶ cellules ou si nous n'avons pas de titre comme pour le cas de P155 VP1 His 265 nous utilisons un volume d'extrait identique à celui des mutants contenant le moins d'HAU par ml. L'incubation après l'infection est encore de 5 jours à 37°C. Ensuite, nous extrayons à nouveau au RDE. Les extraits sont alors titrés pour la présence de HAU et analysés par immunobuvardage.

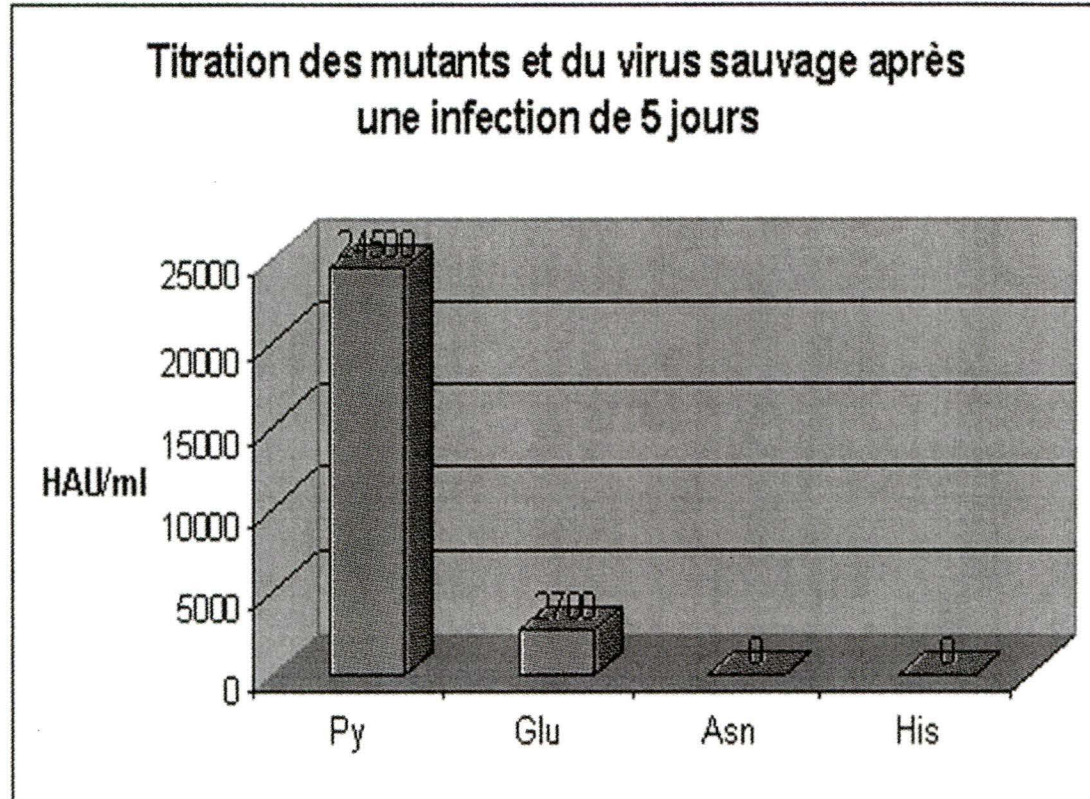
A. Graphique représentant la titration des extraits infectés par nos échantillons.

Par titration des HAU (Matériel et méthodes), nous pouvons analyser les particules virales qui ont été en mesure d'infecter les cellules. Nous constatons que le mutant P155 VP1 Asn 265 et le mutant P155 VP1 His 265 ne produisent pas de particules agglutinantes alors que le mutant P155 VP1 Glu 265 en est capable.

B. Immunobuvardage sur les extraits d'infections.

Après l'extraction au RDE, nous analysons le contenu protéique des extraits obtenus par immunobuvardage. La membrane a été hybridée par anti-VP1 et ensuite réhybridée avec anti VP2/VP3. Par ce résultat, nous arrivons à la conclusion que seul le mutant P155 VP1 Glu 265 a la capacité de produire du virus infectieux alors que les deux autres mutants ne possèdent pas cette capacité. Wt : P155 VP1 Asp 265; Asn : P155 VP1 Asn 265; Glu : P155 VP1 Glu 265; His : P155 VP1 His 265.

A



B

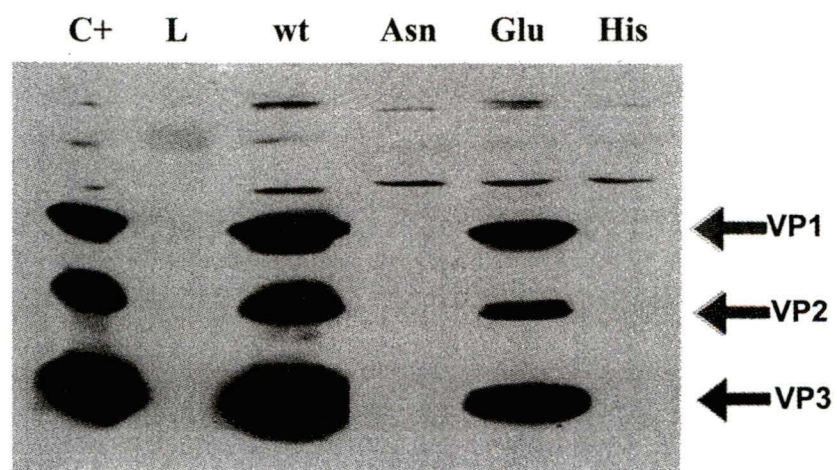
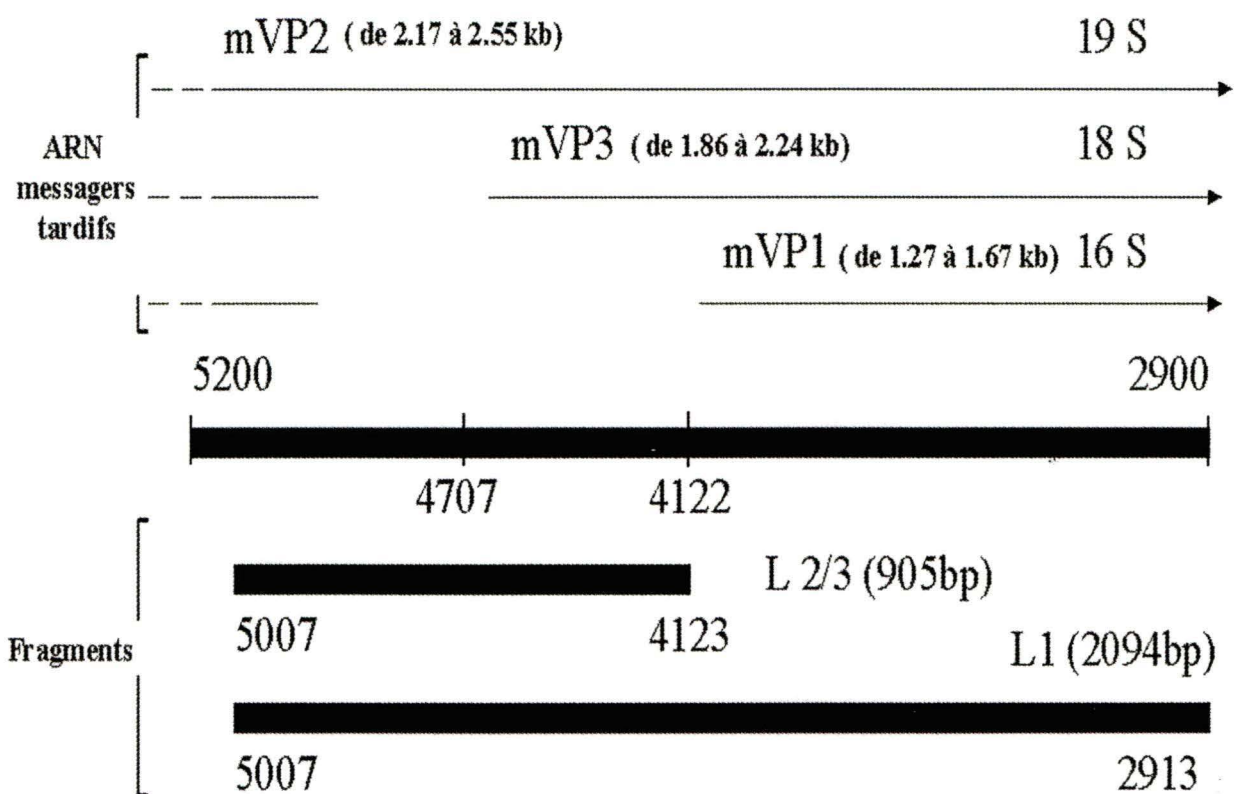


Figure 11. Fragments d'ADN convertis en sondes destinées à hybrider avec les ARNm tardifs des Northern.

Cette illustration nous permet de visualiser les régions des ARNm que les sondes d'ADN peuvent reconnaître. La raison pour laquelle nous utilisons deux sondes pour le Northern Blot est la suivante : l'ARNm du gène VP1 est plus abondant que les deux autres par un facteur de 10. Alors, pour être sûr de détecter l'ARNm de VP2 et VP3, nous avons créé la sonde L2/3. Cette sonde se retrouve surtout à l'intérieur de l'intron de VP1 alors, celle-ci ne met donc pas l'ARNm de VP1 en évidence.



Nôtres (Chen et Fluck, 2001). Une des raisons pour l'hétérogénéité du matériel détectée sur les blots est bien connu et tient à la structure de la portion 5' proximale de ces messagers. Les extrémités « cappées » sont dispersées sur l'ADN sur une distance de 100 nucléotides (du nucléotide 5170 au nucléotide 5070). De plus, les 3 mRNAs contiennent de 1 à 6 copies d'une séquence « leader » de 57 nucléotides (nt 5076 à nt 5020, figure 1). Les particularités de structure sont liées du fait que les évènements post-transcriptionnels dont sont issus les messagers s'effectuent dans des molécules d'ARN géantes contenant jusqu'à 10 copies du génome viral complet (qui est circulaire).

Pour l'étude des ARNm tardifs viraux, nous avons choisi de rechercher ceux-ci à deux moments après la transfection, soit à 26h pt et à 72h pt. Pour cette étude, nous récupérons l'ARN des cellules transfectées en utilisant le Trizol. Après l'extraction, nous quantifions l'ARN total par spectrophotométrie. Ceci nous permet de soumettre des quantités égales d'ARN à l'intérieur de chaque électrophorèse, 10 ug d'ARN dans le cas des échantillons collectés à 26h pt et 20 ug pour ceux collectés à 72h. L'échantillon analysé dans les pistes #5 (voir figure 12) fournit un contrôle négatif correspondant à des cellules transfectées avec le vecteur procaryotique (pNN) ne contenant pas de séquences virales.

Lorsque nous utilisons la sonde L1, les autoradiogrammes révèlent des différences entre RtsP155 et les mutants au niveau de l'accumulation des ARNm de VP1 (figure 12, A, partie gauche des panneaux 1 et 2). À 26h pt, le mutant P155 Asn 265 possède la quantité d'ARNm de VP1 qui se rapproche le plus de celle de RtsP155 (figure 12, A1, piste 1 et 3), alors que les mutants P155 VP1 Glu 265 et P155 VP1 His 265 en contiennent un peu (figure 12, A1, piste 2 et 4). Ce résultat suggère que l'activité transcriptionnelle du mutant P155 VP1 His 265 est bien présente, quoique faible.

À 72h pt, P155 VP1 Glu 265 est celui des trois mutants qui démontre l'accumulation la plus importante de mVP1 (figure 12, A2, piste 2). Ce résultat peut s'expliquer par le fait que seul ce mutant est capable d'initier un second cycle de réplication (voir essais d'infections). Par contre, le mVP1 de P155 VP1 Asn 265 est peu abondant, tandis qu'il n'y a pas d'ARNm détectable pour P155 VP1 His 265 (figure 12, A2, pistes 3 et 4). Le résultat de l'analyse de mVP1 concorde avec nos résultats de Western concernant l'accumulation de la protéine VP1. Nous pouvons conclure que pour les mutants P155 VP1 Glu 265 et P155 VP1 Asn 265, la mutation influence l'accumulation de l'ARNm et par conséquent celle de la protéine aussi. Dans le cas de P155 VP1 His 265, les effets sont

parallèles puisque la nondétectabilité du messenger s'accompagne de celle de la protéine, à 72h pt en tout cas.

Nous avons ensuite réhybridé les membranes avec la sonde L2/3 spécifique aux messagers de VP2 et VP3. Le résultat obtenu pour les échantillons de 72h pt est donc comparable à celui déjà montré en A2 est montré au panneau B. Nous observons que l'abondance des mVP2 et mVP3 varie en parallèle avec celle de mVP1. Donc, il semble que l'effet des mutations s'exerce non seulement sur la production ou l'accumulation de mVP1 mais aussi sur ceux de mVP2 et de mVP3. La concordance notée sur la production des protéines tardives ne s'explique donc pas uniquement par la co-translocation de VP1, VP2 et VP3 vers le noyau et suggère que VP1 contrôle directement ou indirectement non seulement sa propre production mais aussi celle de VP2 et de VP3.

Afin de nous assurer que les différences observées entre les mutants sont réelles, nous avons vérifié la quantité d'ARNm de l'actine présente dans nos échantillons. La sonde utilisée est un oligonucléotide qui a une séquence complémentaire à l'ARNm de l'actine (gracieuseté du Dr Claudine Rancourt, Université de Sherbrooke) que nous avons marqué à l'extrémité en utilisant le γ^{32} P-ATP et l'enzyme T4 PNK. Le résultat de la figure (12, C), est concluant. La quantité d'ARNm d'actine ne diffère que

très peu dans les extraits collectés au même moment. Les différences observées pour ce qui est des ARNm viraux tardifs sont donc réelles et ne peuvent correspondre à une différence de quantité d'ARN déposée dans le gel.

E) L'expression des gènes viraux tardifs requiert la présence d'une ou de plusieurs protéines synthétisées entre 19 et 26h après la transfection.

L'analyse de l'ARN à l'aide de sondes mettant en évidence les ARNm viraux tardifs suggère que l'abondance de ceux-ci est régulée par la protéine VP1. Ceci impliquerait que l'expression des gènes viraux, précoces et tardifs, est contrôlée par plus d'une protéine virale, et pas seulement par la protéine précoce LT. Pour vérifier la validité de cette hypothèse, nous avons décidé d'utiliser une approche déjà employée auparavant par Handa et Sharp (1980) dans le cas de SV40, approche qui fait usage de la cycloheximide (cyclo). L'effet de la cyclo est de bloquer la synthèse des protéines en empêchant la fixation du GTP sur le facteur d'élongation EF2 au niveau des ribosomes. Par cette approche, nous désirons investiguer si l'accumulation des ARNm de la région précoce et celle de la région tardive sont sous le contrôle de protéines semblables ou différentes.

Cette investigation a été réalisée au même moment que celle décrite dans la section précédente. En effet, les ARN ont été ici encore récoltés à 26h pt et 72h pt mais cette fois les cellules avaient été traitées avec de la cycloheximide (25 ug/ml) pendant les 7 dernières heures précédant la récolte des ARN. Ainsi nous comparons dans la même expérience des extraits de 26h et 72h pt, obtenus sans ou après traitement à la cyclo. La figure 12 montre que l'accumulation des ARNm précoces et tardifs n'est pas sous le même contrôle. À 26h, lorsque nous ajoutons la cyclo dans nos cellules, il y a une réduction très marquée de l'accumulation des messagers tardifs par rapport aux cellules qui n'ont pas été en contact avec la cyclo (figure 12, A1, comparer pistes 1-5 à gauche avec pistes 1-5 à droite). À 72h au contraire, il n'y a pas de différence au niveau des messagers tardifs de VP1 entre les cellules ayant été en contact ou non avec la cyclo (figure 12, A2, même comparaison qu'en A1) comme si le facteur protéique produit et requis entre 19h et 26h pt n'était plus nécessaire, ou existant maintenant en concentration saturante. Une observation semblable est faite pour les messagers de VP2 et de VP3, tels que détectés à 72h pt (figure 12, B même comparaison droite-gauche). Toujours avec des ARN récoltés à 72h, nous notons que pour les ARNm précoces au contraire des tardifs, il y a augmentation de la quantité détectés après traitement à la cyclo (figure 12, D). Cet effet de la cyclo sur la synthèse des ARNm précoces a déjà été observé auparavant par Handa

et Sharp dans le cas de SV40 (1980). Dans notre cas, cet effet indique que l'absence d'un effet de la cyclo sur l'abondance des ARNm tardifs à 72h ne reflète en rien une détérioration de la viabilité cellulaire ou virale.

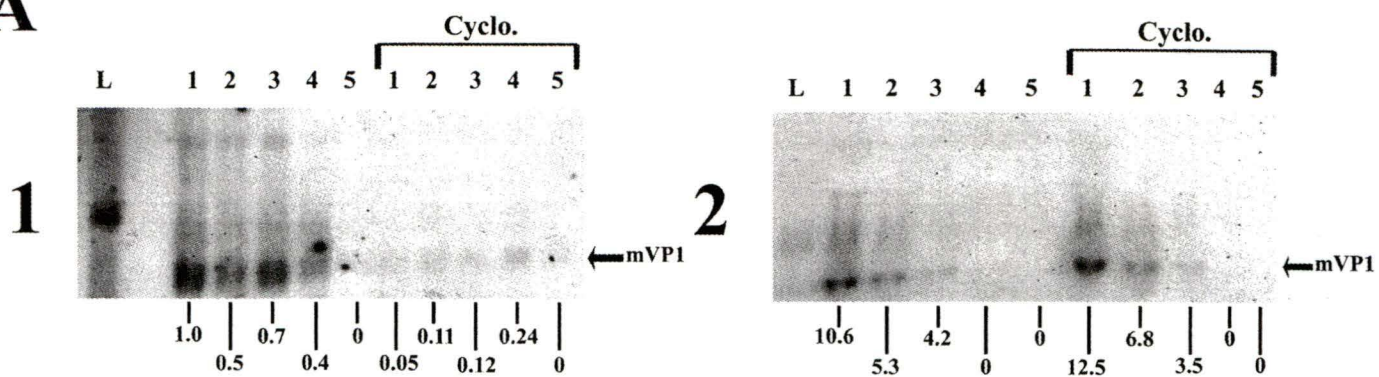
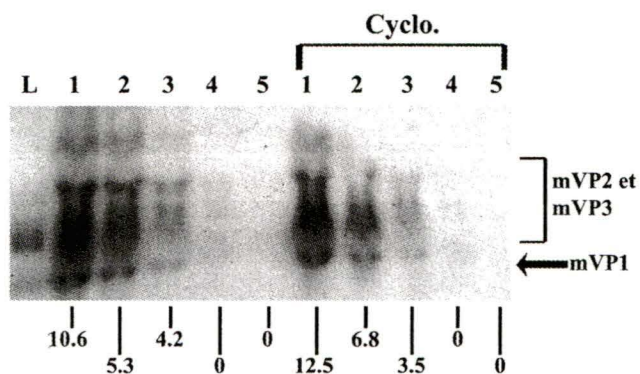
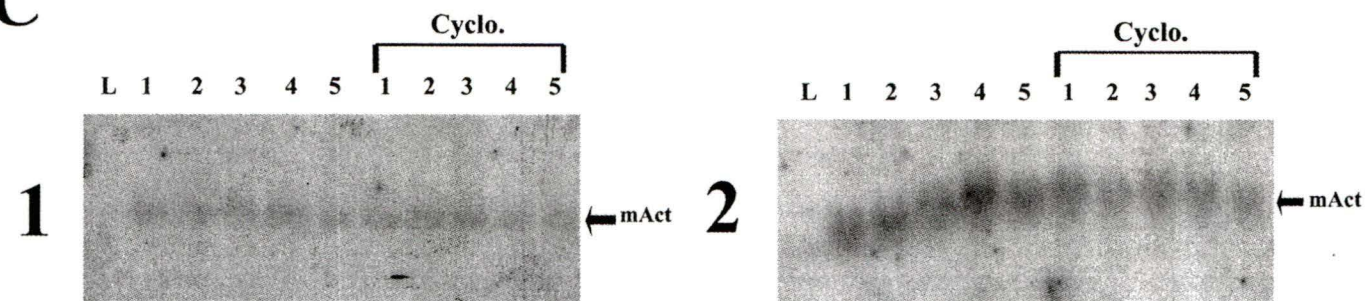
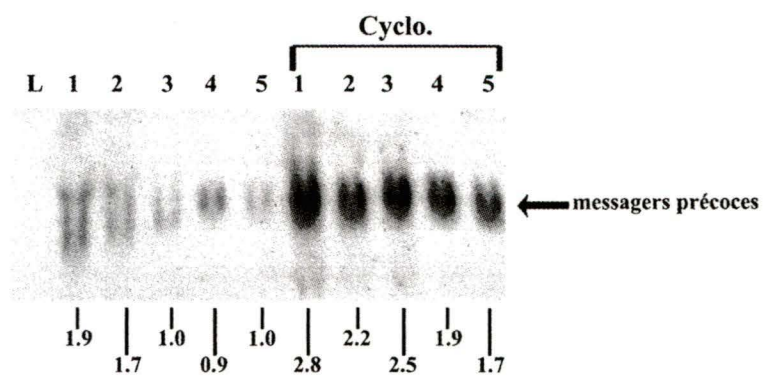
En conclusion, il semble que l'expression des gènes précoces et celle des gènes tardifs ne soit pas régulée par les mêmes protéines virales. La réduction de l'accumulation des ARNm tardifs ne peut s'expliquer, par un effet toxique de la cyclo sur la cellule, puisque cette même cyclo semble avoir peu d'effet sur l'abondance de l'ARNm de l'actine et bien au contraire augmenter l'abondance des ARNm viraux précoces. Les explications les plus triviales de ces résultats paraissant écartées, il semble bien que VP1 soit la protéine qui joue le rôle d'activateur des gènes viraux tardifs.

F) Les mutations introduites dans le codon 265 de VP1 n'influencent pas la stabilité de la matrice d'ADN.

Nous pouvons imaginer que certaines des mutations, dont His 265 en particulier, auraient pu affecter la stabilité de l'ADN viral. En effet VP1 pourrait contribuer à mettre l'ADN à l'abri de l'action des nucléases pendant la phase tardive du cycle viral jusqu'à l'encapsidation finale du génome. Quoique peu convaincante cette hypothèse méritait d'être

Figure 12. Effet des mutations sur la production des ARNm tardifs.

Les molécules RtsP155 (piste 1), P155 VP1 Glu 265 (piste 2), P155 VP1 Asn 265 (piste 3), P155 VP1 His 265 (piste 4) et pNN (piste 5, sert de contrôle négatif) ont été transfectées dans des cellules ScopT₁. La moitié des cultures sont traitées à 19h et à 65h avec de la cyclo pendant 7h (indiqué cyclo dans la figure) alors que l'autre ne l'est pas. Après une incubation de 26h ou 72h, toutes les cultures traitées ou non à la cyclo, sont récoltées et soumises au traitement au Trizol afin de récupérer l'ARN et l'analyser par Northern Blot. Pour le gel avec les ARN recueillis à 26h (gel # A1 et C1), nous avons déposé 10 ug d'ARN total dans les puits. Alors que pour le gel avec les extraits d'ARN de 72h (gel # A2, B, C2 et D), nous avons mis 20 ug d'ARN total dans chaque puit. La section A de la figure correspond aux membranes qui ont été hybridées par la sonde L1 qui met en évidence l'ARNm de VP1 avec les extraits recueillis à 26h (1) et à 72h (2). La section B correspond à la membrane A2 réhybridée avec la sonde L2/3 qui met en évidence les messagers de VP2 et VP3. (C) Ensuite, nous avons vérifié si les différences observées des ARNm entre chaque échantillon n'étaient pas dues à un problème de « loading », alors nous avons hybridé les membranes de la section (A) avec la sonde actine. (D) Correspond à la membrane, ayant les échantillons récoltés à 72h, hybridée avec la sonde précoce afin de détecter les ARNm précoces des mutants et du virus sauvage.

A**B****C****D**

examinée. Nous avons donc analysé par Southern Blot la quantité d'ADN provenant de cellules transfectées par les mutants à 48h pt et aussi à 72h pt (figure 13). Mentionnons qu'à 72h le deuxième cycle de réplication virale débute, tout au moins pour le virus sauvage.

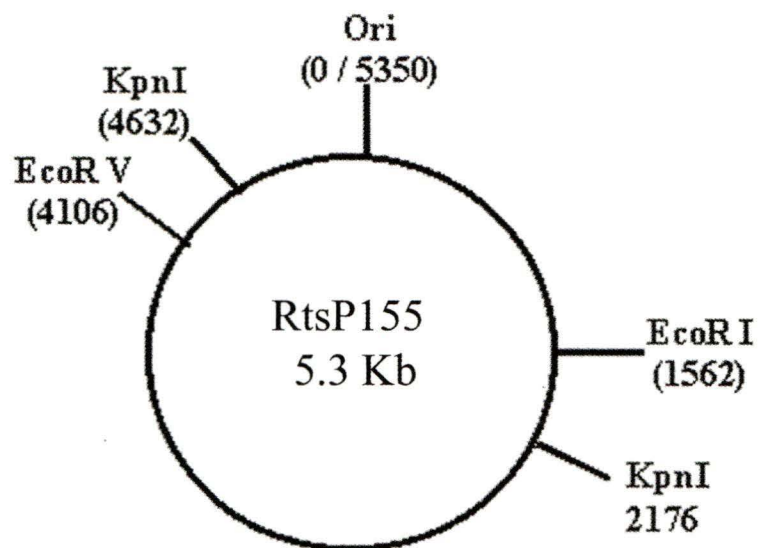
La membrane montrée à la figure 13 A, contient l'ADN de petit poids moléculaires de cellules incubées 48h pt, extrait par la méthode de Hirt (1969). Cet ADN est digéré par l'endonucléase *KpnI* avant d'effectuer l'électrophorèse. Cette digestion génère deux fragments puisque nous retrouvons deux sites de cet enzyme sur l'ADN viral. La membrane montrée à la figure 13 B contient également de l'ADN extrait par la méthode de Hirt (1969), mais de cellules incubées 72h pt; dans ce cas-ci l'ADN viral est linéarisé par l'enzyme *EcoRV* (l'ADN viral ne contient qu'un site *EcoRV*). Mentionnons que l'ADN des deux membranes a également été digéré aussi par l'enzyme *DpnI*. Cet enzyme clive en de multiple fragments l'ADN d'origine procaryote, en d'autres terme, il dégrade l'ADN que nous avons transfecté mais qui ne s'est pas répliqué dans la cellules eucaryote. Pour l'hybridation des membranes, nous avons utilisé une sonde radiomarquée élaborée à partir du génome viral complet.

Lorsque nous examinons la figure 13 A, nous pouvons observer que l'accumulation d'ADN viral répliqué dans la cellule eucaryote est sensiblement équivalente pour RtsP155 ainsi que pour les mutants à 48h pt. Donc, aucun des trois mutants ne semble causer une instabilité particulière de l'ADN viral répliqué. À 72h pt (membrane B de la figure 13), l'ADN de RtsP155 est sensiblement plus abondant que celui de n'importe lequel des mutants. Pour ceux-ci les différences sont peu importantes.

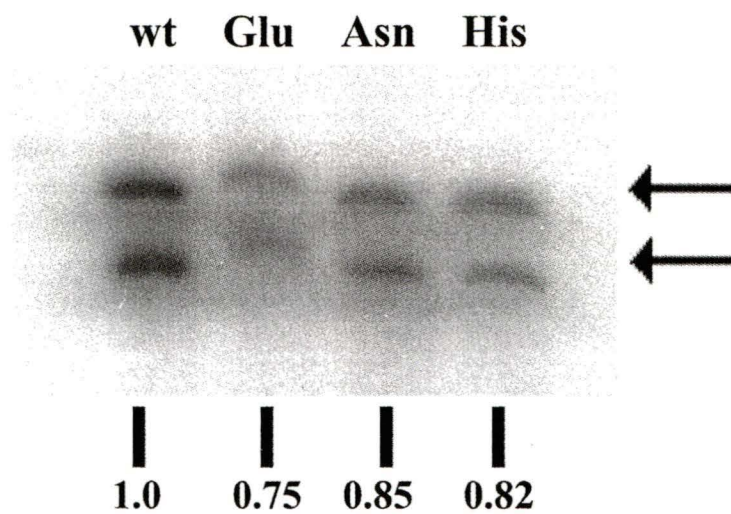
À la lumière de ces résultats, les différences que nous avons observées au niveau des messagers tardifs à 26 et 72 heures pt ne reflètent pas directement des différences dans l'abondance des différentes matrices d'ADN présentes dans les cellules. À titre d'exemple, soulignons le contraste qu'offrent les mutants P155 VP1 Glu 265 et P155 VP1 Asn 265. À 72h pt, le premier a accumulé nettement plus d'ARNm tardifs que le second (figure 12, A2 et B, piste 2 et 3), alors qu'en termes de matrice d'ADN si un avantage quantitatif existe, c'est plutôt en faveur du second (Figure 13 B).

Figure 13. Détection de l'ADN viral présent dans les cellules transfectées

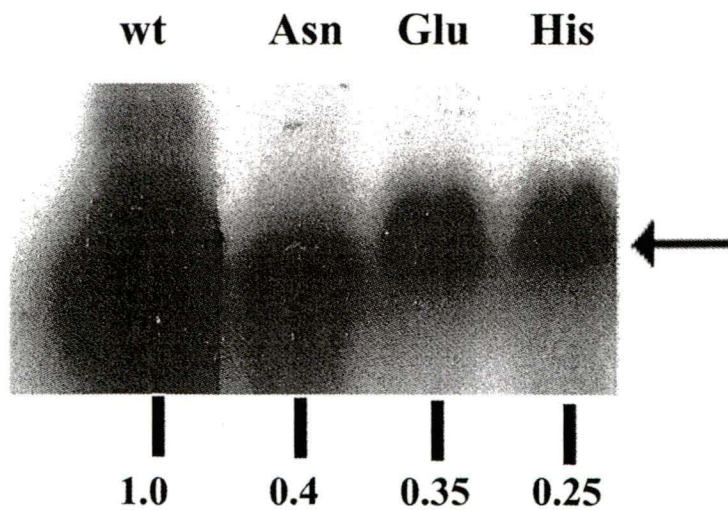
Après une incubation de 48 ou 72 heures à 37°C de cultures transfectées, l'ADN viral est extrait des cellules ScopT1 selon la méthode de Hirt (1967). Après fragmentation de l'ADN non-répliqué par une digestion par *DpnI*, l'ADN répliqué est clivé par *EcoRV* ou *KpnI*. L'ADN est alors soumis à une électrophorèse en gel horizontal d'agarose 1%, transféré sur une membrane de nylon (Hybond N+ d'Amersham), hybridé avec une sonde radioactive représentant la totalité du génome de Py et la membrane de nylon est alors soumise à une autoradiographie. Il est important ici de mentionner que pour P155 VP1 Glu 265 dans le gel de 48h, on retrouve pour toutes les bandes à l'intérieur de cette ligne le même problème de migration soit que toutes les bandes se retrouvent plus hautes que les bandes des autres pistes. La quantification de chaque bande pour les gels sont situées sous l'échantillon.



48 heures
Digéré par *KpnI*



72 heures
Digéré par *EcoRV*



G) Études des complexes nucléoprotéiques

Après l'analyse des Northern blots, nous avons élaboré trois hypothèses susceptibles d'expliquer les différents résultats obtenus jusqu'alors. La première hypothèse suppose que VP1 pourrait stabiliser les ARNm tardifs. La seconde, que VP1 pourrait jouer un rôle dans les modifications post-transcriptionnelles inhérentes à la production des ARNm tardifs; nous savons en effet que la structure des produits de transcription primaires de la région virale tardive est très particulière chez Py (ARN « géants », voir Introduction). L'inconvénient de ces deux premières hypothèses est que ni l'une ni l'autre n'a reçu le moindre support jusqu'à présent. Il n'en est pas de même de la troisième hypothèse qui se réfère à certains rôles de VP1 dans la transcription du génome viral.

Cette hypothèse est appuyée par certaines publications (Garcia et al., 2000; Ricci et al., 1992). Lors de l'introduction j'ai abordé l'interaction entre la protéine virale tardive VP1 et le facteur de transcription YY1, ainsi que le rôle de VP1 dans le remodelage de la chromatine virale dans le cas de SV40 tout au moins (Ambrose et al., 1986). En nous basant sur des informations disponibles sur YY1 et VP1, nous avons donc envisagé un modèle hypothétique sur le rôle possible de VP1 dans la transcription tardive.

Après que le virus ait pénétré dans la cellule et que l'ADN entre dans le noyau, YY1, qui est très abondant dans la cellule, se fixerait sur les sites Y1 et Y2 (éventuellement Y3) et recruterait une déacétylase. L'hypoacétylation des histones de la région tardive (ou du promoteur tardif) s'opposerait à la transcription de cette région. Pendant ce temps, la transcription des gènes précoces s'effectuerait. À la différence du promoteur tardif, le promoteur viral précoce inclut une boîte TATA, mais ne comporte aucun site YY1. Ensuite, il aurait réplication de l'ADN. Avec la réplication qui débiterait, l'ADN se trouve présent dans le noyau en de nombreuses copies (ultimement 10^6 copies par noyau). Cette abondance aurait pour conséquence un déséquilibre entre le nombre de molécules d'HDAC disponibles dans la cellule et le nombre de molécules de YY1 portées par l'ADN viral. Ceci permettrait à la transcription tardive de survenir sur de la chromatine nantie d'histones acétylées à la suite de la réplication. Il aurait alors début d'expression de la protéine VP1. Celle-ci pourrait se lier à YY1 et empêcher la formation des complexes YY1-déacétylase, ou encore déstabiliser de tels complexes. De plus, VP1 pourrait modifier la conformation de YY1, le rendant capable de fixer l'histone acétyl transférase (HAT) (Lee et *al.*, 1995; Lewis et *al.*, 1995; Shi et *al.*, 1991)

Comment démontrer que VP1 joue le rôle décrit précédemment? En principe, nous pourrions vérifier l'acétylation des histones virales des mutants et du virus sauvage afin de déterminer si la chromatine virale est modifiée de façon à ce que la transcription soit facilitée ou non, suivant le cas. Nous savons qu'une région transcrite est associée avec des histones acétylées et vice-versa. S'il n'y a pas de différence au niveau de l'acétylation alors le problème se situe ailleurs et notre modèle doit être revu.

Pour tester notre modèle, nous avons utilisé la technique d'immunobuvardage pour déterminer le niveau d'acétylation pour chaque mutant par rapport au virus sauvage. À l'aide d'anticorps reconnaissant les histones hyperacétylées et totales, nous espérons être en mesure d'observer l'état des complexes nucléoprotéiques pour chaque souche. Pour cette analyse, nous avons transfecté des cellules ScopT₁ avec nos ADN. Par la suite, les cellules sont incubées à 37°C pour 72h. Après cette incubation, nous ajoutons 1 ml d'une solution de formaldéhyde 11% par pétri ou encore 10 ml de milieu de culture. Les pétris sont alors agités et incubés pendant 2 minutes à 37°C (expérience pilote non montrées). Cette étape s'avère essentielle car le traitement à la formaldéhyde permet le renforcement des liens ADN-protéines et protéines-protéines à l'intérieur des complexes viraux (« cross-linking »), donc nos complexes deviennent

plus stables ce qui, nous espérons, permettra de préciser leur contenu. Après le traitement à la formaldéhyde, les complexes sont récupérés par la méthode au RDE déjà expliqué auparavant (Matériel et méthodes et partie A de la section Résultats). Après la récupération des complexes viraux, nous effectuons une séparation de complexes nucléoprotéiques viraux par ultracentrifugation avec coussin de saccharose 20%. Cette étape a été ajoutée après que nous ayons observé lors des essais préliminaires que le contrôle négatif (cellules transfectées par pNN) contenait des histones. Nous avons donc conclu que les histones cellulaires étaient libérées des débris cellulaires lors de l'extraction au RDE. La meilleure méthode pour enlever cette contamination était de séparer de nos extraits les complexes de 75S et de 240S (Garcea et Benjamin, 1983).

Avant d'analyser les histones des complexes, nous avons vérifié l'état des complexes du virus sauvage et des mutants. Nous avons donc hybridé les membranes avec les sérums anti-VP1 et anti-VP2/VP3. Le panneau 1 de la figure 14 A, nous permet de constater que les échantillons démontrent tous les patrons de protéines tardives déjà observés.

Pour explorer la présence et la qualité des histones dans ces échantillons, nous avons eu recours à deux anticorps de la compagnie Upstate qui nous permettaient de mettre en évidence d'une part des

histones acétylées et d'une autre des histones totales. Ces anticorps sont l'anti-H4 penta et l'anti H2B. L'anti-H4 penta est un anticorps polyclonal qui reconnaît les isoformes d'histones H4 hyperacétylées soit les histones tétra- et tri- acétylées alors qu'il ne reconnaît pas les histones H4 bi et mono-acétylées (Lin et *al.*, 1989; Perry et *al.*, 1993). Tandis que l'anti-H2B, lui aussi un anticorps polyclonal censé reconnaître tous les isoformes de l'histone H2B peu importe leur degré d'acétylation. Donc, après l'analyse des protéines tardives, nous avons hybridé les membranes avec l'anticorps anti-H4 penta. Au vu du panneau 2 de la figure 14 A, nous notons que l'extrait purifié de cellules transfectées par RtsP155 contient le plus d'histones H4 hyperacétylées. Les extraits correspondant à P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 Glu 265 contiennent peu d'H4 hyperacétylées. Dans le cas de P155 VP1 His 265 comme celui du contrôle négatif (pNN) nous ne détectons pas d'H4 hyperacétylées.

En analysant le panneau 3 de la figure 14 A, nous remarquons que le niveau d'histones H2B est le même que celui des histones H4 hyperacétylées. Donc, il semble que les différences que nous avons détectées lors de l'utilisation du sérum anti-H4 penta proviendraient de la quantité de complexes que nous avons extraits au départ. L'hypothèse la plus plausible serait que pour RtsP155 il y a beaucoup de complexes 240S et 75S alors que pour les P155 VP1 Asn 265 et P155 VP1 Glu 265, il y a

des complexes de 75S mais peu de 240S ce qui expliquerait ces différences. Nous savons que les histones des complexes 240S ont une acétylation plus élevée que celles des complexes 75S (LaBella et Vesco, 1980; Coca-Prados et *al.*, 1980). De plus, nous ne détectons pas d'histones pour P155 VP1 His 265. Est-il possible que nous ayons pas extrait de complexes pour ce mutant; la méthode RDE étant inadéquate pour une telle opération, puisque sa cible est un récepteur ou pseudo-récepteur lié au complexe nucléoprotéique viral en travers de VP1?

Nous avons donc recherché combien d'ADN viral contenait nos extraits nucléoprotéiques purifiés. Pour l'extraction de l'ADN, nous avons traité ces extraits à la protéinase K durant une nuit à 37°C. Ensuite, ces extraits sont soumis à une extraction au phénol-chloroforme et l'ADN est précipité avec de l'isopropanol, avant analyse par Southern. À l'examen de la figure 14, B, deux éléments ressortent. D'abord, les complexes purifiés de P155 VP1 Asn 265 contient moins d'ADN que ceux produits par RtsP155, alors que les deux se situaient au même niveau pour ce qui est des protéines virales de structure (figure 14, A). Pour P155 VP1 Asn 265, il pourrait donc y avoir un problème d'interaction entre la capsid (VP1+VP2+VP3) et la chromatine (ADN+histones). Deuxièmement, il semble que par la méthode que nous utilisons, nous n'arrivons pas à isoler des complexes nucléoprotéiques viraux pour P155 VP1 His 265, car nous

ne détectons pas d'ADN par Southern blot. Pourtant, nous savons que ce mutant accumule des quantités normales d'ADN que nous détectons sans difficulté par la méthode de Hirt (figure 13) jusqu'à 72h.

Figure 14. Effet des mutations sur le niveau d'acétylation des histones des complexes viraux.

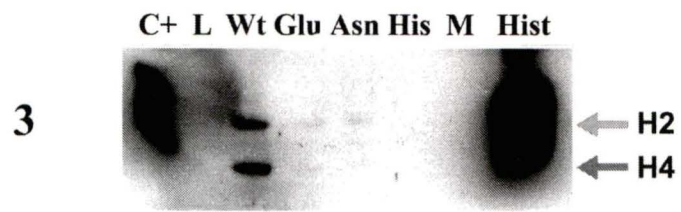
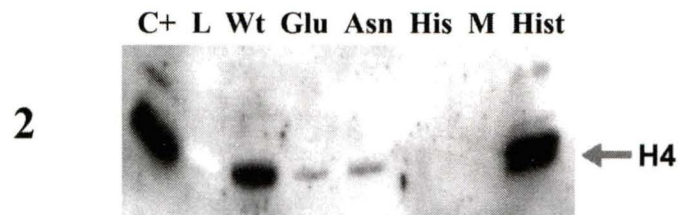
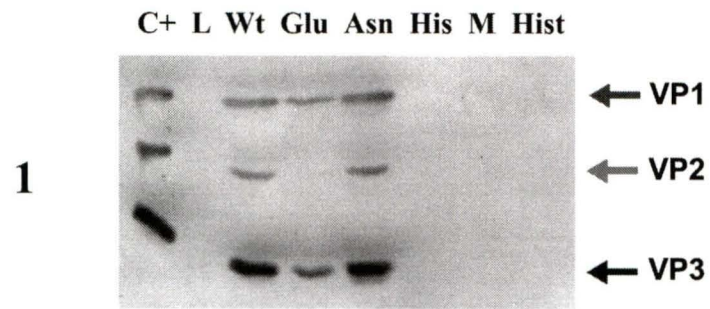
A. Vérification de l'acétylation des histones des complexes.

Les molécules P155 VP1 Asp 265 (Wt), P155 VP1 Glu 265 (Glu), P155 VP1 Asn 265 (Asn) et P155 VP1 His 265 (His) et un contrôle négatif soit le vecteur pNN seul (M), ont été transfectées dans des cellules ScopT₁. Après une incubation de 72h, les cellules ont été traitées avec la formaldéhyde pour « cross-linker » les complexes nucléoprotéiques viraux. À la suite de ce traitement, ces complexes nucléoprotéiques viraux sont extraits des cellules par la méthode au RDE (Crawford, 1962; Bourgaux, 1964 et Matériel et méthodes). Ensuite, ces échantillons sont centrifugés à haute vitesse au travers d'un coussin de saccharose 20% afin de séparer les complexes nucléoprotéiques viraux (75S et 240S) des composants de petit poids moléculaire. Un immunobuvardage est effectué par après afin de vérifier la composition protéique des complexes viraux recueillis au fond du tube. La membrane a été hybridée, par ordre chronologique avec les sérums suivants : anti-VP1 et anti VP2, anti-H4 penta (Upstate), et enfin, anti-H2B (Upstate).

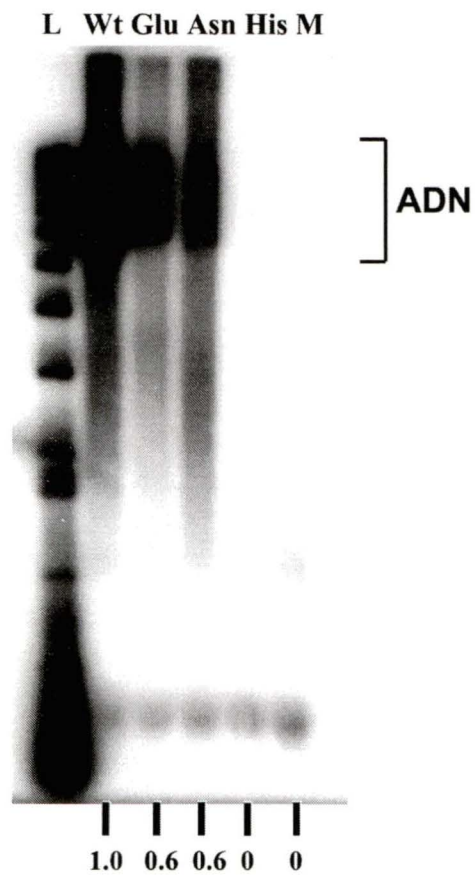
B. Analyse de l'ADN des complexes nucléoprotéiques.

Avec les échantillons déjà analysés par immunobuvardage (voir A), nous avons effectués un Southern Blot afin d'observer s'il y a de l'ADN virale dans le matériel recueilli au fond du tube après ultracentrifugation comme on s'attend à la présence des complexes nucléoprotéiques.

A



B



Discussion

Phénotype des mutants VP1 Glu 265, VP1 Asn 265 et VP1 His 265

Trois mutants différents ont été créés à partir de pNNRtsP155 dans le but de déterminer si l'acide aminé 265 de VP1 déjà déterminant pour la recombinaison (Gendron et *al.*, 1996; Bourgaux, P., données non publiées) joue dans la réplication virale un rôle distinct de celui joué dans l'encapsidation (Stamatos et *al.*, 1987). Ces mutants au lieu de l'Asp 265 caractéristique de la protéine VP1 sauvage codent pour un Glu, un Asn ou un His. Ces génomes mutés ont été transfectés dans des cellules ScopT₁ et nous avons comparé leur cycle réplcatif d'une série de points de vue.

Production d'hémagglutinine virale et production de protéines virales

En étudiant ces deux aspects, nous voulions analyser la capacité de chaque génome à produire les protéines tardives et les complexes viraux. Pour ce qui est de la détection des HAU, la plus petite unité que nous pouvions mettre en évidence est le pentamère de VP1 (Garcea et *al.*, 1987; Zullo et *al.*, 1986). L'avantage de la méthode était sa rapidité d'exécution (environ 2 heures). Par contre l'immunobuvardage nous permettait d'observer si la substitution du codon 265 de VP1 affectait la production de VP1, mais également celle de VP2 et de VP3.

Pour ce qui est des HAU, nous avons remarqué que les trois mutants avaient tous des phénotypes différents, aucun n'étaient semblable à celui de P155 VP1 Asp 265 (figure 8). Les phénotypes les plus remarquables sont sans doute ceux causés par les substitutions par Asn et par His. En effet, la première substitution semble causer une accélération de la production de VP1 tandis que la seconde rend cette production indétectable. Les résultats de l'immunobuvardage sont intéressants à deux titres. D'une part, ils confirment les résultats du titrage des HAU : VP1 est détectable précocement chez P155 VP1 Asn 265 et pas du tout chez P155 VP1 His 265. D'autre part, ce qui est vrai pour VP1, l'est aussi pour VP2 et pour VP3. Bien sûr, nous pouvions penser que cette constatation pouvait s'expliquer simplement par le fait que VP1 joue un rôle important dans la translocation – et donc la stabilisation- des protéines tardives. Cependant, comme nous y reviendrons dans la section suivante, le processus par lequel VP1 contrôle l'abondance de VP2/VP3 est sans doute plus complexe.

Production des ARNm et de l'ADN

Clairement, les résultats obtenus lors de l'analyse des agglutinines et des protéines virales soulevaient plusieurs questions. Tout d'abord, comment expliquer que la mutation de P155 VP1 Asn 265 accélère la production ou l'accumulation des protéines tardives par rapport au virus

sauvage, alors que chez P155 VP1 Glu 265, cette production ou accumulation est retardée? Est-il possible que VP1 ait un rôle sur la régulation des gènes tardifs? Comment expliquer que chez P155 VP1 His 265 la protéine VP1 soit tout simplement indétectable? Pour répondre à ces questions, nous avons vérifié au Northern blot pour déceler la production d'ARNm de ces mutants. Ainsi avons-nous noté une concordance entre l'accumulation des ARNm tardifs et l'accumulation des protéines tardives. À 20h, l'abondance de l'ARNm tardif (surtout VP2 et VP3) de P155 VP1 Asn 265 est supérieure à celle notée pour l'ADN viral sauvage (résultat non montré) alors que le niveau d'ARNm de P155 VP1 Glu 265 est bas. Toutefois à 72h pt, le contraire survient, P155 VP1 Glu 265 accumule plus d'ARNm tardifs que P155 VP1 Asn 265. Ces résultats laissent supposer que VP1 exerce un contrôle (positif?) sur sa propre synthèse ainsi que sur celle de VP2 et de VP3. Afin de préciser davantage la nature du processus contrôlant l'accumulation de l'ARN viral, nous avons repris un schéma expérimental employé auparavant par Handa et Sharp (1980). L'expérience consistait à ajouter de la cycloheximide dans le milieu de culture des cellules transfectées 7h avant la récolte des ARN. Par cette expérience nous avons pu voir quel effet exerçait l'inhibition de la synthèse protéique sur la production des ARNm viraux, suivant que cette inhibition intervenait au début de la phase tardive (19-26h) ou vers la fin de celle-ci (65-72h pt) (Chen et Fluck, 2001). Ainsi avons-nous noté

que la cyclo bloquait l'accumulation des ARNm tardifs entre 19 et 26h pt, mais non entre 65 et 72h pt. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que la synthèse de VP1 débute autour de 19-26h pt, alors que VP1 existe en grandes quantités dans les cultures entre 65 et 72h pt. Par ailleurs, la cyclo stimule la synthèse des ARNm précoces aussi bien à 65-72h pt qu'à 19-26h pt (résultat non montré), ce qui ne peut s'expliquer que par une dépression nette de la synthèse de la protéine précoce LT, connue pour réguler négativement l'expression des gènes viraux précoces (Reed et *al.*, 1976; Tegtmeyer et *al.*, 1975; Handa et Sharp, 1980).

Nos résultats s'accordent bien avec la notion voulant que l'activité des gènes tardifs est entretenue par la protéine tardive VP1, et non celle supposant que ces gènes tardifs sont activés par la protéine virale précoce LT. Alors que cette dernière idée avait été avancée par plusieurs auteurs (Farmerie et Folk, 1984; Kern et *al.*, 1986; Bergqvist et *al.*, 1990), il faut noter qu'il a été démontré que le promoteur tardif du Py est actif même en l'absence de la protéine grand T (Bourachot et *al.*, 1990; Cahill et Carmichael, 1989; Kern et *al.*, 1985). Comme les résultats de Handa et Sharp (1980) concernaient SV40, nos résultats sont donc les premiers à impliquer directement VP1 plutôt que LT dans le contrôle des ARNm tardifs du polyome.

À cet égard, il est intéressant de revenir sur la cinétique d'action de la cyclo. Qu'elle soit ajoutée au milieu de culture entre 19 et 26h pt, ou entre 65 et 72h pt, la cyclo stimule l'accumulation des ARNm précoces, ce qui suggère qu'en absence de cyclo, grand T est produit à des niveaux plus au moins constants. À moins d'hypothèses supplémentaires plus ou moins complexes, nous voyons mal comment grand T maintenu à un niveau plus au moins constant (quel que soit le mutant concerné) puisse causer une activation de l'expression des gènes tardifs. Dans le cas des ARNm tardifs, une addition de cyclo entre 19 et 26h pt, c'est-à-dire quand l'activation des gènes tardifs débute, inhibe l'accumulation des ARNm tardifs. Alors qu'une addition plus tardive de la cyclo (65-72h pt) survenant alors que VP1 est très abondant dans la cellule est sans effet (figure 12). Couplée à l'effet des mutations dans VP1, la cinétique d'action de la cyclo est donc compatible avec une action stimulante de VP1 sur l'accumulation des ARNm tardifs. Finalement, pour revenir à grand T, il est difficile d'imaginer comment une concentration de cyclo suffisante pour augmenter la production d'ARNm précoces (figure 12 panneau D) n'aurait aucun effet sur la synthèse d'ARNm tardifs (figure 12, panneau B à droite). Le grand T semble donc bien exclu comme stimulateur de l'expression des gènes tardifs, au niveau des ARNm en tout cas.

Pour s'assurer de la validité de ces résultats, nous avons vérifié la production et l'accumulation de l'ADN viral de chaque mutant même si tous les mutants tardifs analysés à ce jour, sauf exception faite des mutants d'Amati (Garcia et *al.*, 2000), synthétisent et accumulent l'ADN viral normalement. Il était possible que les différences observées jusqu'à présent émanent d'une stabilité différente de la matrice d'ADN dû à l'accumulation variable de la protéine VP1 entre chaque mutant. Quand, nous observons les résultats, tous les ADN sont en quantité équivalente à 48h et même à 72h pour les mutants en tout cas. En plus, l'Asn a une quantité importante d'ADN par rapport à Glu, toutefois celui-ci a beaucoup plus d'ARNm par rapport au premier. Donc, la réplication de l'ADN viral n'est pas en cause ici.

Production des complexes nucléoprotéiques viraux

Les phénotypes de nos mutants peuvent s'expliquer par l'intervention de nombreux mécanismes. Toutefois ces mécanismes ne peuvent s'exercer qu'à deux niveaux différents : d'abord l'ADN viral (ou la chromatine virale) ; ensuite les pré-messagers ou messagers tardifs. Les processus éventuellement concernés sont la transcription tardive, les modifications post-transcriptionnelles, dont l'épissage et la stabilisation des ARNm.

Nous avons décidé de nous intéresser tout d'abord aux interactions qui nous paraissent les plus probables, compte tenue des propriétés déjà connues de VP1. VP1 est une protéine qui se lie non-spécifiquement à l'ADN (Chang et *al.*, 1993) et qui, comme mentionné dans notre introduction, est dotée de la propriété de modifier le positionnement des nucléosomes sur l'ADN viral (Ambrose et *al.*, 1990; Blasquez et *al.*, 1986). On sait depuis longtemps que cette localisation conditionne l'activation et la répression des fonctions de la chromatine virale. Pendant longtemps, aucun rapprochement n'a été fait entre réarrangement de la chromatine virale et une autre particularité concernant VP1 qui, bien sûr, a été découverte indépendamment.

L'acétylation des histones associées à l'ADN viral varie au cours du cycle de réplication virale, elle s'élève surtout au cours de la phase tardive, et est maximale lors de l'encapsidation (LaBella et Vesco, 1980). Dès lors, comment VP1 stimule-t-elle la transcription ? Il existe dans la cellule un facteur de transcription qui interagit d'une part avec VP1 et d'autre part avec des sites se retrouvant sur l'ADN du polyome qui sont exclusifs à la région tardive. Ce facteur est la protéine YY1 (Ying-Yang 1).

Afin de déterminer si la protéine VP1 a un rôle à jouer dans la transcription nous avons voulu vérifier l'état des histones pour chaque mutant et les comparer avec celles du virus sauvage. Ainsi avons-nous isolé et analysé les complexes nucléoprotéiques de Py. Comme il a été

mentionné lors de l'introduction, nous pouvons retrouver au moins trois formes de complexes nucléoprotéiques du Py (Garcea et Benjamin, 1983). Pour ménager la stabilité et la composition de ces complexes, nous avons dû effectuer certains traitements avant même l'extraction au RDE. Tout d'abord, nous avons traité les cellules transfectées avec la formaldéhyde dans le but de stabiliser les liens ADN-protéines et protéines-protéines (Garber et *al.*, 1980). Pour s'assurer que l'analyse ne soit pas compromise par la présence des histones cellulaires libres, et éventuellement des protéines virales libres, nous avons procédé à une ultracentrifugation permettant d'isoler les complexes nucléoprotéiques de 75S ou plus. Nos résultats, en particulier, ceux montrant que les complexes nucléoprotéiques de P155 VP1 Asn 265 semblent contenir beaucoup moins de H4 hyperacétylées que les complexes du type sauvage ne peuvent pas être utilisés pour suggérer que VP1 cause une hyperacétylation des histones stimulant du même coup l'expression des gènes tardifs. Ce qui nous manque afin de déterminer si oui ou non VP1 joue un rôle important dans la transcription est l'analyse des complexes nucléoprotéiques de P155 VP1 His 265, pour autant que de tels complexes existent dans la cellule. Il est à noter que lors de cette étude, les résultats des protéines tardives des mutants et du virus sauvage étaient identiques à ceux que nous avons lors des études précédentes (voir figure 9, section analyse des protéines tardives). Pour cette étude, le mutant le plus important dans l'analyse est

P155 VP1 His 265. Malheureusement, pour obtenir le renseignement nécessaire, nous ne disposons pas de méthode d'extraction qui puisse remplacer efficacement la méthode RDE. Avant de poursuivre, il est important de mentionner que nous n'avons pas utilisé l'analyse ChiP faute de temps. Pour effectuer cette analyse, il faut tout d'abord immunoprécipiter les complexes viraux avec un anticorps dirigé contre les histones acétylées et ensuite, effectuer un PCR sur l'ADN viral. Mais pour l'avenir, il sera intéressant d'effectuer cette expérience afin de résoudre la question si VP1 a une influence sur l'acétylation des histones du virus.

Hypothèse

Comme mentionné dans l'introduction, le génome viral du Py en répllication existe dans la cellule permissive sous trois formes distinctes (Garcea et Benjamin, 1983 : 75S, 95S et 240S). La richesse en protéines tardives de chacune de ces formes diffère. La protéine VP1 qui possède un rôle d'encapsidation et de distribution des deux autres protéines tardives auraient un rôle de distribution pour permettre à tous les éléments d'être en place et d'assurer une certaine régulation de tous ces processus. Alors, il est possible que la protéine VP1 aurait un rôle dans cette régulation et favoriserait la transcription tardive. Donc, au départ, la chromatine 75S qui est la forme de départ de l'ADN viral favoriserait la transcription précoce. Cette chromatine favoriserait aussi la répllication

lors de son attachement à la matrice nucléaire (Chen et *al.*, 1998; Garcea et Amati, 2000; Shirmbeck et Deppert, 1991). Alors qu'au moment où VP1 s'assemble alentours de cette chromatine, celle-ci favoriserait la transcription tardive, peut-être par son interaction avec YY1. Donc, il aurait recrutement des éléments nécessaires ou encore son déplacement dans la matrice nucléaire favorisant la transcription tardive. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier l'interaction de la protéine VP1 du mutant P155 VP1 His 265 avec YY1. On sait que VP1 interagit avec YY1 (Palková et *al.*, 2000). Toutefois, si nous pouvions démontrer que VP1 de P155 VP1 His 265 n'interagit plus avec YY1 par double-hybride ou/et par immunoprécipitation d'extrait cellulaire transfecté, nous renforcerions l'hypothèse que c'est par une interaction YY1 et VP1 que la transcription tardive est activée. Bien sûr, il se peut que cette interaction VP1-YY1 soit un élément déclencheur dans un processus plus complexe que nous avons imaginé. Si l'expérience démontre que VP1 His 265 n'interagit plus avec YY1, il sera important à ce moment de vérifier l'acétylation des histones virales pour ce mutant afin de démontrer qu'il y a bien un effet répresseur sur la chromatine virale en absence de cette interaction VP1-YY1.

Conclusion

Nous savions déjà que la substitution de l'a.a. 265 de la protéine VP1 amenait une inhibition de la recombinaison (Gendron et al., 1996). Toutefois, nous voulions déterminer si, à l'intérieur du cycle lytique du Py, VP1 avait un autre rôle que l'encapsidation. Donc, notre groupe a produit trois mutants ayant un autre a.a. au niveau du codon 265 et nous les avons caractérisés. Par ces expériences, nous avons découverts que la protéine VP1 pouvait avoir un rôle plus important que nous l'imaginions. En fait, la conclusion de ces expériences indique que VP1 aurait réellement un rôle à jouer dans le « early-late switch » du cycle lytique du Py. Alors, la protéine VP1 aurait un rôle d'activation de la transcription tardive car lorsqu'elle est absente, il y a inhibition de la synthèse des ARNm tardifs. VP1 serait probablement, à l'aide de YY1, la protéine responsable d'amorcer la transcription tardive et même de recruter les facteurs nécessaires pour cette étape.

Remerciements

Je tiens à remercier de tout mon cœur les Docteurs Pierre et Danielle Bourgaux-Ramoisy pour m'avoir accepté dans leur laboratoire malgré mon inexpérience.

Je remercie de plus tous les collègues qui m'ont encouragé lorsque j'en avais besoin. Un merci particulier aux gens du laboratoire de Sherif qui m'ont aidé énormément. J'espère un jour vous remettre cet aide.

Un énorme merci au nouveau retraité André Lacroix pour son aide et de son écoute, je ne l'oublierai jamais.

Merci également à Carole Picard et Normand Laframboise pour leurs nombreux services.

Je remercie tous mes amis ainsi que les professeurs du département qui m'ont rendu un peu plus compétant dans mon domaine.

Et je tiens surtout à remercier toute ma famille, mes amis et surtout ma copine Majorie qui m'ont toujours soutenu et encouragé tout au long de mon périple.

Bibliographie

Acheson, N., Buetti, E., Scherrer, K., Weil, R. (1971). Transcription of the polyoma virus genome: synthesis and cleavage of giant late polyoma specific RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2231-2235

Adami, G., Carmichael, G.G. (1987). The length but not the sequence of the polyoma virus late leader exon is important for both late RNA splicing and stability. *Nucleic Acids Res.* 15: 2593-2610

Ambrose, C., Blasquez, V., Bina, M. (1986). A block in initiation of simian virus 40 assembly results in the accumulation of minichromosomes containing an exposed regulatory region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3287-3291

Baretino, D., Feigenbutz, M., Valcarcel, R., Stunnenberg, H.G. (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 22: 541-542

Barouch, D.H., Harrison, S.C. (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virology* 68: 3982-3989

Bauer, P. H., Cui, C., Stehle, S.C., DeCaprio, J.A., Benjamin, T.L. (1999). Discrimination between sialic acid-containing receptors and pseudoreceptors regulates polyomavirus spread in the mouse. *J. Virology* 73: 5826-5832

Behm, M., Lowman, H., Ng, S.-C., Bina, M. (1988). Analysis of temperature-sensitive mutations in the simian virus 40 gene encoding virion protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9421-9425

Bélanger, M., Charbonneau, S., Gendron, D., Samson, E., Abou Elela, S., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P. (2001). The gene encoding the major viral structural protein stimulates recombination in polyomavirus DNA. *Virology* 285: 291-301

Blasquez, V., Stein, A., Ambrose, C., Bina, M. (1986). Simian virus 40 protein VP1 is involved in spacing nucleosomes in minichromosomes. *J. Mol. Biol.* 191: 97-106

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113

Bourgaux, P. (1964). The fate of polyomavirus in hamster, mouse and human cells. *Virology* 23: 46-55

Brady, J.N., Lavialle, C.A., Radonovich, M.F., Salzman, N.P. (1981). Stable association of viral protein VP1 with simian virus 40 DNA. *J.Virology* 39: 432-437

Cahill, K.B., Carmichael, G.G. (1989). Deletion analysis of the polyomavirus late promotor: evidence for both positive and negative elements in the absence of early proteins. *J.Virology* 63: 3634-3642

Cai, X., Chang, D., Rottinghaus, S., Consigli, R.A. (1994). Expression and purification of recombinant polyomavirus VP2 protein and its interactions with polyomavirus proteins. *J.Virology* 68: 7609-7613

Caruso, M., Iacobini, C., Passananti, C., Felsani, A., Amati, P. (1990). Protein recognition sites in polyomavirus enhancer: formation of a novel site for NF-1 factor in an enhancer mutant and characterization of a site in the enhancer D domain. *EMBO J.* 9: 947-955

Chang, D., Cai, X., Consigli, R.A. (1993). Characterization of DNA binding properties of polyomavirus capsid proteins. *J.Virology* 67: 6327-6331

Chang, D., Haynes, J.I., Brady, J.N., Consigli, R.A. (1992). The use of additive and subtractive approaches to examine the nuclear localization sequence of the polyomavirus major capsid protein VP1. *Virology* 189: 821-827.

Chartrand, P., Gusew-Chartrand, N., Bourgaux, P. (1981). Integrated polyoma genomes in inducible permissive transformed cells. *J.Virology* 39: 185-195

Chen, X.S., Stehle, T., Harrison, S.C. (1998). Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implication for participation of VP2 in viral entry. *EMBO J.* 17: 3233-3240
Crawford, L.V. (1969). Purification of polyomavirus. *Fundamental techniques in virology*. Academic Press, N.Y. p.75-81

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 162: 156-159

Coca-Prados, M., Hsu, M.-T. (1979). Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. II. Biochemical and electron microscopic analysis of simian virus assembly. *J.Virology* 31: 199-208

Coca-Prados, M., Vidali, G., Hsu, M.-T. (1980). Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. III. Study of histone modification. *J.Virology* 36 : 353-360

Delbecchi, L., Gendron, D., Bourgaux, P. (1981). Inducible permissive cells transformed by a temperature-sensitive polyoma virus: superinfection does not allow excision of the resident viral genome. *J.Virology* 39: 196-206

Delos, S.E., Montross, L., Moreland, R.B., Garcea, R.L. (1993). Expression of the polyomavirus VP2 and VP3 proteins in insect cells: coexpression with the major capsid protein VP1 alters VP2/VP3 subcellular localisation. *Virology*. 194: 393-398

Dedon, P.C., Soultz, J.A., Allis, D., Gorovsky, M.A. (1991). A simplified formaldehyde fixation and immunoprecipitation technique for studying protein-DNA interactions. *Anal. Biochem* 197: 83-90

Dulbecco, R., Freeman, G. (1959). Plaque production by polyomavirus. *Virology*: 396-397

Farmerie, W.G., Folk, W.R. (1984). Regulation of polyomavirus transcription by large tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6919-6923

Fernandez-Munoz, R., Coca-Prados, M., Hsu, M.-T. (1979). Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. I. Methods of isolation and characterization in CV1 cells. *J.Virology* 29: 612-623

Forstova, J., Krauzewicz, N., Wallace, S., Street, A.J., Diworth, S.M., Beard, S., Griffin, B.E. (1993). Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J.Virology* 67: 1405-1413

Fried, H., Cahan, L.D., Paulson, J.C. (1981). Polyoma virus recognizes specific sialyloligosaccharide receptors on host cells. *Virology* 109: 188

Garber, E.A., Seidman, M.M., Levine, A.J. (1980). Intracellular SV40 nucleoprotein complexes: synthesis to encapsidation. *Virology* 107: 389-401

Garber, E.A., Seidman, M.M., Levine, A.J. (1978). The detection and characterization of multiple forms of SV40 nucleoprotein complexes. *Virology* 90: 305-316

Garcea, R.L., Benjamin, T.L. (1983). Isolation and characterization of polyoma nucleoprotein complexes. *Virology* 130 : 65-75

Garcea, R.L., Salunke, D.M., Caspar, D.L.D. (1987). Site-directed mutation affecting polyomavirus capsid-self-assembly *in vitro*. *Nature* 329: 86-87

Garcia, M.-I., Perez, M., Caruzo, M., Sthandier, O., Ferreira, R., Cermola, M., Macchia, C., Amati, P. (2000). A mutation of the DE loop of the VP1 protein that prevents polyomavirus transcription and replication. *Virology* 272: 293-301

Gélinas, C., Chartrand, P., Bastin, M. (1982). Polyomavirus mutant with normal transforming ability but impaired tumorigenic potential. *J.Virology* 43: 1072-1081

Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P. (1988). A substitution in a nonconserved region of polyomavirus large T antigen which causes a thermosensitive mutation. *Virology* 165: 165-171

Gendron, D., Delbecchi, L., Bourgaux-Ramoisy, D., Bourgaux, P. (1996). An enhancer of recombination in polyomavirus DNA. *J.Virology* 70: 4748-4760

Gilbert, J.M., Goldberg, I.G., Benjamin, T.L. (2003). Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J.Virology* 77: 2615-2622

Handa, H., Sharp, P.A. (1980). Expression of early and late simian virus 40 transcripts in the absence of protein synthesis. *J.Virology* 34: 592-597

Harrison, S.C. (1990). Principle of virus structure. *Virology*, 2nd ed. Raven Press, New-York In B.N. Fields and D.M. Knipes (ed.) 37-61

Haynes II, J.I., Chang, D., Consigli, R.A. (1993). Mutations in the putative calcium-binding domain of polyomavirus VP1 affect capsid assembly. *J.Virology* 67: 2486-2495

Hirano, T., Iwakura, Y. (1990). A novel transcriptional regulatory factor that binds to the polyoma virus enhancer in a developmental stage-specific manner. *Biochimie* 72: 327-336

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J.Mol.Biol.* 26: 365-369

Jakobovits, E.B., Aloni, Y. (1980). Isolation and characterization of various forms of simian virus 40 DNA-protein complexes. *Virology* 102: 107-118

Kern, F.G., Daily, L., Basilico, C. (1985). Common regulatory elements control gene expression from polyoma early and late promoters in cells transformed by chimeric plasmids. *Mol Cell Biol.* 5: 2070-2079

Kern, F.G., Pellegrini, S., Cowie, A., Basilico, C. (1986). Regulation of polyomavirus late promoter activity by viral early proteins. *J.Virology* 60: 275-285

Krauzewicz, N., Streuli, C.H., Stuart-Smith, N., Jones, M.D., Wallace, S., Griffin, B.E. (1990). Myristylated polyomavirus VP2: role in the life cycle of the virus. *J.Virology* 64 : 4414-4420

LaBella, F., Vesco, C. (1980). Late modifications of simian virus 40 chromatin during the lytic cycle occur in an immature form of virion. *J.Virology* 33: 1138-1150

Leavitt, A.D., Roberts, T.M., Garcea, R.L. (1985). Polyoma virus major capsid protein, VP1. Purification after high level expression in *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 260 : 12803-12809

Lee, J.S., Galvin, K.M., See, R.H., Eckner, R., Livingston, D., Moran, E., Shi, Y. (1995). Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes & Development* 9: 1188-1198

Lewis, B.A., Tullis, G., Seto, E., Horikoshi, N., Weinmann, R., Shenk, T. (1995). Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *J.Virology* 69 : 1628-1636

Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L., Harrison, S.C. (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354: 278-284

Liu, Z., Carmichael, G.G. (1993). Polyoma virus early-late switch: regulation of late RNA accumulation by DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8494-8498

Martelli, F., Iacobini, C., Caruso, M., Felsani, A. (1996). Characterization of two novel YY1 binding sites in the polyomavirus late promoter. *J. Virology* 70 : 1433-1438

Mezes, B., Amati, P. (1994). Mutations of polyomavirus VP1 allow in vitro growth in undifferentiated cells and modify in vivo tissue replication specificity. *J. Virology* 68: 1196-1199

Moreland, R.B., Garcea, R.L. (1991). Characterization of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP1. *Virology* 185: 513-518

Moreland, R.B., Montross, L., Garcea, R.L. (1991). Characterization of the DNA-binding properties of the polyomavirus capsid protein VP1. *J. Virology* 65: 1168-1176

Montross, L., Watkins, S., Moreland, R.B., Mamon, H., Caspar, D.L., Garcea, R.L. (1991). Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing in the major capsid protein VP1. *J. Virology* 65: 4991-4998

Ozer, H.L., Tegtmeyer, P. (1972). Synthesis and assembly of SV40. II. Synthesis of the major capsid protein and its incorporation into viral particles. *J. Virology* 9: 52-60

Palková, Z., Spanielová, H., Gottifredi, V., Hollanderová, D., Forstová, J., Amati, P. (2000). The polyomavirus major capsid protein VP1 interacts with the nuclear matrix regulatory protein YY1. *FEBS Letters* 467: 359-364

Polisky, B., McCarthy, B. (1975). Location of histones in SV40 DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2895-2899

Rautmann, G., Glaichenhaus, N., Nahgashfar, Z., Breathnach, R., Rassoulzadegan, M. (1982). Complementation of a tsa mutant and replication of a recombinant DNA carrying the viral ori region in mouse cells transformed by polyoma virus. *Virology* 122: 306-317

Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L., Murikami, W.T. (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295: 110-115

Reed, S.I., Stark, G.R., Alwine, I.C. (1976). Autoregulation of SV40 gene A by T antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3083-30

Ricci, L., Maione, R., Passananti, C., Felsani, A., Amati, P. (1992). Mutations in the VP1 coding region of polyomavirus determine differentiating stage specificity. *J. Virology* 66: 7153-7158

Sahli, R., Freund, R., Dubensky, T., Garcea, R., Bronson, R., Benjamin, T. (1993). Defect in entry and altered pathogenicity of a polyoma virus mutant blocked in VP2 myristylation. *Virology* 192: 142-153

Salunke, D.M., Caspar, L.D., Garcea, R.L. (1986). Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 46 : 895- 904

Schaffhausen, B.S., Benjamin, T.L. (1976). Deficiency in histone acetylation in nontransforming host-range mutants of polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1092-1096

Schirmbeck, R., Deppert, W. (1991). Structural topography of simian virus 40 DNA replication. *J. Virology* 65: 2578-2588

Shi, Y., Seto, E., Chang, L.S., Shenk, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* 67: 377-388

Shi, Y., Lee, J.-S., Galvin, K.M. (1997). Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys. Acta* 1332: F49-F66

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517

Stamatos, N.M., Chakrabarti, S., Moss, B., Hare, J.D. (1987). Expression of polyomavirus virion proteins by a vaccinia virus vector: association of VP1 and VP2 with the nuclear framework. *J.Virology* 61: 516-525

Stehle, T., Harrison, S.C. (1997). High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implication for assembly and receptor binding. *EMBO J.* 16: 5139-5148

Tan, K.B., Sokol, F. (1974). Replication of SV40 in permissive cells: assembly of virus components. *J. General Virology* 25 : 37-51

Tegtmeyer, P., Schwartz, M., Collins, J.K., Rundell, K. (1975). Regulation of tumor antigen synthesis by simian virus 40 gene A. *J.Virology* 16 : 168-178

Tooze, J. (1980). Molecular biology of tumor viruses. DNA tumor viruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* Cold Sping Harbor, New-York. 87

Twigg, A.J., Sherratt, D. (1980). Trans-complementable copy number mutants of plasmid Col E1. *Nature* 283: 216-218

van der ploeg, L.H.T., Flavell, R.A. (1980). DNA methylation in the human globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell* 19: 947-957